

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**CRISPR/CAS9 KULLANILARAK SIĞIR PREİMLANTASYON
EMBRİYOLARININ TROFEKTODERM FARKLILAŞMASINDA CDX2
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Emel TÜTEN SEVİM
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Ekim 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**CRISPR/CAS9 KULLANILARAK SIĞIR PREİMLANTASYON
EMBRİYOLARININ TROFEKTODERM FARKLILAŞMASINDA CDX2
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Emel TÜTEN SEVİM
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Ekim 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

**CRISPR/CAS9 KULLANILARAK SIĞIR PREİMLANTASYON
EMBRİYOLARININ TROFEKTODERM FARKLILAŞMASINDA CDX2
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Emel TÜTEN SEVİM
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Ekim 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

**CRISPR/CAS9 KULLANILARAK SIĞIR PREİMLANTASYON
EMBRİYOLARININ TROFEKTODERM FARKLILAŞMASINDA CDX2
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Emel TÜTEN SEVİM
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 20/10/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Sezen ARAT

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Doç. Dr. Taki KARSLI

Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

ÖZET

CRISPR/CAS9 KULLANILARAK SIĞIR PREİMLANTASYON EMBRIYOLARININ TROFEKTODERM FARKLILAŞMASINDA CDX2 ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Emel TÜTEN SEVİM

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Ekim 2023; 76 sayfa

Model memeli hayvan olarak farelerde zigottan blastosiste dönüşüm sürecinde hücre soyu farklılaşması hakkında detaylı çalışmalar yürütülmüş olmasına rağmen sığırlarda bu süreç belirsizliğini korumaktadır. Bununla beraber, yardımcı üreme teknikleri kullanılarak üretilen sığır embriyolarında sıklıkla yaşanan erken gebelik kayıpları çözülmesi gereken bir sorun olarak güncelliğini korumaktadır. Preimplantasyon gelişim sırasında meydana gelen trofektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM) farklılaşmasında etkili olan faktörlerin doğru bir şekilde anlaşılmasıyla erken gebelik kayıpların önlenebileceği öngörülmektedir. Bu kapsamda, sığırların preimplantasyon gelişim sürecinde yer aldığı ve fare embriyolarında TE/ICM soylarının farklılaşması için gerekli olduğu bilinen kaudal tip homeobox transkripsiyon faktörü-2 (CDX2) geninin sığırlardaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, CRISPR/Cas9 teknolojisi ile CDX2 geni susturulmuş (Knock-out) olan embriyolar in vitro üretilerek, CDX2 geninin susturulmasının sığır preimplantasyon gelişimine etkisi takip edilmiştir. Çalışma materyalini mezbahalardan alınan ovaryumlardan elde edilen oositler oluşturmuştur. Sığır oositlerine sadece Cas9'u kodlayan mRNA enjekte edilerek kontrol grubu ve CDX2 hedefli sgRNA+Cas9 mRNA enjekte edilerek deney grubu oluşturulmuştur. Preimplantasyon gelişiminin 8. günündeki sığır blastosistleri fikse edilerek TE/ICM hücrelerinin belirlenmesi için sırasıyla CDX2, GATA3 ve SOX2 immünohistokimyasal boyama ile görüntü analizi yapılarak embriyo morfolojisi incelenmiştir. Hangi embriyoların CDX2 geni bakımından başarıyla susturulduğunu belirlemek için DNA izolasyonu yapılmış ve miSeq teknolojisi ile genotiplenmiştir.

Tüm analizler sonucunda, CDX2 geni bakımından kontrol ve deney gruplarında embriyo gelişimi bakımından istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ulaşılan bilgiler fare embriyoları ile kıyaslandığında sığır embriyolarının trofektoderm farklılaşmasında blastosist oluşumunda CDX2'nin hayati bir rol oynamadığını göstermiştir. Ayrıca memeli türleri arasında embriyo gelişimi sırasında ilk hücre soyu farklılaşmasının aynı olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, yardımcı üreme teknikleri kullanılarak üretilen sığır embriyolarında meydana gelen

kayıpların sebeplerinin belirlenmesi için sürece dahil olduğu öngörülen bütün genlerin araştırılması gerektiği söylenebilir.

ANAHTAR KELİMELEER: sığır, preimplantasyon, embriyogenez, CRISPR, CDX2, trofektoderm

JÜRİ: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Sezen ARAT

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Doç.Dr. Taki KARSLI

Doç.Dr. Demir ÖZDEMİR



ABSTRACT

INVESTIGATION OF CDX2 ROLE IN TROPHECTODERM DIFFERENTIATION OF BOVINE PREIMPLANTATION EMBRYOS BY USING CRISPR / CAS9

Emel TÜTEN SEVİM

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

October 2023; 76 pages

While detailed studies have been conducted on cell lineage differentiation during the zygote-to-blastocyst formation process in mice as a model mammalian species, this process remains uncertain in bovine. Moreover, early pregnancy losses frequently occur in bovine embryos produced using assisted reproductive techniques, making it an ongoing issue that needs to be addressed. It is anticipated that a better understanding of the factors that effective on the differentiation of trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM) during preimplantation development could help prevent early pregnancy losses. In this context, it was aimed to investigate the role of the caudal type homeobox transcription factor-2 (CDX2) gene in bovine, which is known to be involved in the preimplantation development process of bovine and is required for the differentiation of TE/ICM lineages in mouse embryos. For this purpose, embryos with CDX2 gene silenced (knock-out) using CRISPR/Cas9 technology were produced *in vitro* and the effect of silencing the CDX2 gene on bovine preimplantation development was monitored. The study material consisted of oocytes obtained from ovaries collected from slaughterhouses. Bovine oocytes were injected with mRNA encoding only Cas9 to create a control group, and with CDX2-targeted sgRNA+Cas9 mRNA to form the experimental group. Bovine blastocysts on the 8th day of preimplantation development were fixed and embryo morphology was examined by image analysis for CDX2, GATA3 and SOX2 immunohistochemical staining to identify TE/ICM cells, respectively. DNA isolation was conducted to identify which embryos had successfully silenced the CDX2 gene, and genotyping was performed using the MiSeq technology.

As a result of all the analyses, it has been determined that there is no statistically significant difference in embryo development with respect to the CDX2 gene between the control and experimental groups. The information obtained in this thesis study, when compared to mouse embryos, indicates that CDX2 does not play a vital role in trophoctoderm differentiation and blastocyst formation in bovine embryos. Furthermore, it has been found that the first cell lineage differentiation during embryo development differs among mammalian species. Based on these results, it can be suggested that the investigation of all genes presumed to be involved in the losses observed in bovine

embryos produced using assisted reproductive techniques is necessary to determine the causes.

KEYWORDS: bovine, preimplantation, embryogenesis, CRISPR, CDX2, trophoctoderm

COMMITTEE: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Prof. Dr. Sezen ARAT

Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Assoc.Prof.Dr. Taki KARSLI

Assoc.Prof.Dr. Demir ÖZDEMİR

ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, genom bilim alanlarındaki bilimsel ilerlemeler sonucu, dünyada özellikle sağlık ve tarım alanlarındaki biyoteknolojik uygulamalarda büyük gelişmeler görülmektedir. “Modern biyoteknoloji” ya da “yeni biyoteknoloji” olarak tanımlanan bu gelişmeler, insanlığa daha sağlıklı ve daha kaliteli bir yaşam için eşi görülmemiş fırsatlar sunmaktadır.

TÜBİTAK VİZYON 2023’ün hedeflerine ve öngörülen yol haritasına sadık kalarak gerçekleştirilebilmesi sayesinde Türkiye 20 yıl gibi kısa bir dönemde moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve gen teknolojilerinde küresel bir güç haline gelme potansiyeline sahiptir. Böylece, 21. yüzyılın teknolojisi olarak tanımlanan biyoteknoloji sadece insanımızın yaşam kalitesini yükseltmekle sınırlı olmayan, ekonomik ve teknolojik bir üstünlük kazandıracaktır.

Tamamlanan bu tez çalışmasında kullanılan yöntemler TÜBİTAK VİZYON 2023 projesinde yer alan “Hayvancılıkta Biyoteknoloji ve Gen Teknolojiler” başlığının “Teknoloji Alanı: Genetik Mühendisliği” alt başlığında politika, strateji ve hedefleri arasında belirtilen yöntemler ile örtüşmektedir. Bu yöntemlerin uygulanmasından edinilen tecrübeler ile çiftlik hayvanları yetiştiriciliği alanında gerek verim özelliklerinin iyileştirilmesi gerekse karşılaşılan sorunların elimine edilmesi ve/veya bu sorunların moleküler olarak anlaşılabilmesi için temel oluşturulması hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim sürecinde beni bilgi ve deneyimleriyle yönlendiren, destekleyen, birlikte çalışmaktan her zaman onur ve gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kemal KARABAĞ’a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Hayvan Biyoteknolojisi alanında çalışmamda ilham kaynağım olan, lisans eğitimimden itibaren emeklerini üzerimde hissettiğim; yüksek lisans tez danışmanım Prof. Dr. Sezen ARAT’a, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fulya ÖZDİL’e, ihtiyaç duyduğum her an bana zaman ayıran kıymetli hocam Doç. Dr. Raziye IŞIK’a sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

İspanya Ulusal Tarım ve Gıda Araştırma Enstitüsü- Hayvan Üreme Bölümü laboratuvarlarında çalışma olanağı sağlayan, deneyim kazanma fırsatı veren ve tez projemin tamamlanmasında büyük katkı sağlayan Dr. Pablo BERMEJO-ALVAREZ’e, tez projemin deney aşamalarında yardımları, sıcak-samimi arkadaşlıkları ve misafirperverlikleri için Dr. Julieta GABRIELA HAMZE başta olmak üzere tüm Hayvan Genomik Mühendisliği ekibi’ne (Beatriz, Alba, Ismael, Leopoldo, Priscilla, Pilar) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında tez projem destekleyen TÜBİTAK BİDEB’e özel olarak teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden bu yana benimle olan, kararlarımı saygı gösteren, ayrı şehirlerde olsak dahi desteğini hep yanımda hissettiğim, bu süreci en iyi şekilde tamamlayabilmem için tüm sınırlarını zorlayan, yüklerimi paylaşan, kıymetli eşim Turan SEVİM’e tüm sabrı ve güzel yoldaşlığı için çok teşekkür ederim.

Henüz yürümeye dahi başlamamışken benimle bu serüvene başlayan, en kötü anlarımda bile enerjimi yükselten biriciğim, en kıymetlim, can'ım kızım Nil SEVİM'e kucak dolusu sevgilerimi sunuyorum.

Çocukla birlikte kariyeri bir arada yürütmekte zorlandığım, ihtiyacım olduğu her zaman yanımda olan, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, annem Dilber TÜTEN'e sonsuz teşekkürlerimle...



İthaf

*Bu tez çalışmasını soyadını taşımaktan gurur duyduğum rahmetli babam
İbrahim TÛTEN'e ithaf ediyorum.*

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İthaf	vii
İÇİNDEKİLER	viii
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Üreme (Reprodüktif) Biyoteknolojisi	4
2.1.1. Embriyo transferi	4
2.1.2. <i>In vitro</i> embriyo üretimi	7
2.1.2.1. <i>In vitro</i> maturasyon	9
2.1.2.2. <i>In vitro</i> fertilizasyon	12
2.1.2.3. <i>In vitro</i> kültür	13
2.2. Memeli Preimplantasyon Embriyo Gelişimi.....	14
2.2.1. TE/ICM hücre soylarının farklılaşması	15
2.2.2. TE/ICM farklılaşmasında etkili olan genler	16
2.2.2.1. CDX2 geni.....	17
2.2.2.2. GATA3 ve SOX2 genleri.....	17
2.3. Gen Düzenleme	18
2.3.1. CRISPR/cas9	20
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Laboratuvar gereçleri.....	25
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve medyumlar.....	28
3.1.2.1. NaCl solüsyonu	28
3.1.2.2. Maturasyon medyumunu.....	28

3.1.2.3. Fertilizasyon medyumunu	29
3.1.2.4. Kùltür medyumunu	30
3.1.2.5. İmmunohistokimyasal boyama için kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.2.6. İstatistiksel analizler	33
3.2. Metot	33
3.2.1. Gen düzenleme için CRISPR bileşenlerinin hazırlanması	33
3.2.1.1. CDX2 hedefli gRNA tasarımı	33
3.2.1.2. CRISPR reaktiflerinin (gRNA ve Cas9) hazırlanması.....	34
3.2.2. CDX2 geni düzenlenmiş embriyoların <i>in vitro</i> üretimi.....	34
3.2.2.1. Sığır oositlerinin <i>in vitro</i> maturasyonu.....	34
3.2.2.2. Mikroenjeksiyon.....	35
3.2.2.3. <i>In vitro</i> fertilizasyon	36
3.2.2.4. <i>In vitro</i> kùltür	37
3.2.3. Gelişimsel farklılıklar	38
3.2.4. Morfolojik analizler	38
3.2.4.1. İmmünohistokimyasal boyama ve görüntüleme	38
3.2.4.2. Hücre sayımı	40
3.2.5. Genotipleme.....	40
3.2.5.1. DNA izolasyonu	40
3.2.5.2. Kütüphane hazırlanması	41
4. BULGULAR.....	46
4.1. Gelişimsel farklılıklar.....	46
4.2. Morfolojik analizler.....	47
4.3. Genotipleme	51
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	58
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “CRISPR/Cas9 Kullanılarak Sığır Preimplantasyon Embriyolarının Trofektoderm Farklılaşmasında CDX2 Rolünün Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

20/10/2023

Emel TÜTEN SEVİM



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : santigrad derece

dk : dakika

µl : mikrolitre

µm : mikrometre

µM : mikro molar

g : gram

ml : mililitre

mm : milimetre

mM : mili molar

nm : nanometre

ng : nanogram

nM : nano molar

rpm : dakikada tekrar

sn : saniye

osm : osmoz

Kısaltmalar

AJ : Yapışık Bağlantılar

BSA : Sığır Serum Albümin

BLV : Sığır Lösemi Virüsü

BME : Amino Asit Çözeltisi

BTS : Mavi Dil Virüsü
BW : Bovi-wash
Bç : Baz çifti
CaCl₂ : Kalsiyum Klorür
CDX2 : Caudal Type Home Box
CR : Charles Rosencrans
CRISPR: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri
cRNA : CRISPR RNA'sı
CO₂ : Karbondioksit
DAPI : 4',6-Diamidino-2-fenilindol
DNA : Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP : di Nükleotid Trifosfat
DSB : Çift Zincir Kırık
EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit
ESC : Embriyonik Kök Hücreler
ET : Embriyo Transferi
ETOH : Etil Alkol
FCS : Fetal Buzağı Serumu
FMD : Şap Hastalığı
FSH : Folikül Uyarıcı Hormon
GATA3: GATA Bağlayıcı Protein 3
GJ : İletişim Bağlantıları
GnRH : Gonadotropik Hormon

GV : Germinal Vezikül
GVBD: Germinal Vezikül Yıkımlanması
HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
İNDEL: insersiyon/delesyon
ICM : İç Hücre Kitlesi
IVF : *In Vitro* Fertilizasyon
IVC : *In Vitro* Kültür
IVM : *In Vitro* Maturasyon
IVD : *In Vivo* Üretilmiş
KCI : Potasyum Klorür
KD : Knock-down
KH₂PO₄: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI : Knock-in
KO : Knock-out
KOK : Kumulus-Oosit Kompleksi
LH : Luteinleştirici Hormon
MII : Metafaz II
MEM : Esansiyel Olmayan Amino Asit Çözeltisi
MgCl₂ : Magnezyum Klorür
MgSO₄: Magnezyum Sülfat
MPF : Maturasyon faktörü
mRNA: Mesajcı Rübonükleik Asit
NACI : Sodyum Klorür
NaHCO₃: Sodyum Bikarbonat

NaH₂PO₄: Sodyum Dihidrojen Fosfat

nDNA : nükleer DNA

NHEJ : Homolog Olmayan Uç Birleştirme

NT : Nükleer Transfer

Oct4 : Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü-4

OPU : Ovum Toplama

PAM : Protospacer Bitişik Motif

PBS : Fosfat Tampon Solüsyonu

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFA : Paraformaldehit

pH : Potansiyel Hidrojen

PI : Pronükleer Enjeksiyon

POU5F1: POU sınıf 5 homeobox 1

PVP : Polivinilpirolidon

RBS : Döl Tutmama Sendromu

sgRNA: Tek Rehber Ribonükleik Asit

SOF : Sentetik Ovidükt Sıvısı

SOX2 : SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 2

TALEN: Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazlar

TALP : Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat

TAO : Transillüminasyon-Aspirasyon Ovaryum

Taq : *Thermus aquaticus*

TCM199: Doku Kültür Medyumu

TE : Trofektoderm

tracrRNA: Trans-Aktive Edici crRNA

TJ : Sıkı Bağlantılar

WT : Yabani Tip

YÜT : Yardımcı Üreme Teknikleri

ZFN : Çinko-Parmak Nükleazlar

ZP : Zona-pellusida



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> şartlarda oosit ve embriyo gelişimi (Niemann ve Wrenzycki 2018).....	6
Şekil 2.2. 2001-2020 döneminde kaydedilen sığır embriyolarının sayısı (<i>in vivo</i> türetilmiş, <i>in vitro</i> üretilmiş ve toplam).	7
Şekil 2.3. <i>In vitro</i> embriyo üretim aşamaları (Niemann ve Wrenzycki 2018).....	8
Şekil 2.4. Erken embriyonik gelişimin (preimplantasyon) şematik gösterimi (Niemann ve Wrenzycki 2018).	8
Şekil 2.5. İmmatür oositlerin kalite kriterlerine göre sınıflandırılması (Hasler vd. 2017).	11
Şekil 2.6. Sığır preimplantasyon gelişimi sırasında meydana gelen önemli gelişimsel olayların dinamiği (Zhang ve Smith 2015).	14
Şekil 2.7. Farklı memeli türlerinde bir zigottan implantasyona kadar döllenmeden sonraki gelişimin zamanlaması (Llobat 2021).	15
Şekil 2.8. Endonükleaz aracılı programlanabilir gen düzenleme yöntemleri (Lamas Toranzo, 2021).	19
Şekil 2.9. DNA çift sarmal kırık onarım mekanizmaları (Maeder ve Gersbach 2016'dan değiştirilmiştir).	19
Şekil 2.10. Sığır üretiminde mikroenjeksiyon yoluyla gen susturma ve somatik hücre nükleer transferi yöntemlerinin karşılaştırılması.....	22
Şekil 2.11. Sığır zigotlarında mikroenjeksiyon uygulamasının aşamaları; (a) bir tutma pipeti ile zigotun hareketsizleştirilmesi, (b) enjeksiyon iğnesi ile zona pellusida ve alttaki plazma zarının penetrasyonu, (c) ilgili efektör molekülleri içeren küçük bir hacmin enjeksiyonu, ve (d) enjeksiyon tamamlandıktan sonra iğnenin geri çekilmesi (Laible, 2018).	23
Şekil 2.12. Mikroenjeksiyon ve elektroporasyon yöntemlerinin grafiksel özeti. (Lin ve Van Eenennaam 2021'den düzenlenmiştir).	24
Şekil 3.1. CDX2 geni 1. ekzon bölgesi üzerinden hedef bölgeler için tasarlanmış farklı gRNA'lar. Sarı renk ekzon bölgesini, mavi renk gRNA baz dizisini, yeşil renk PAM bölgelerini göstermektedir.	34
Şekil 3.2. Sığır oositlerinin ovaryumlardan folikül aspirasyon yöntemi ile elde edilmesi.	35
Şekil 3.3. Mikroskop altında kaliteli olduğu için seçilen kumulus-oosit kompleksleri (4x büyütme).	35
Şekil 3.4. Kontrol ve deney grubunda mikroenjeksiyon süreci.....	36
Şekil 3.5. Muhtemel zigotların SOF besiyeri damlalarında kültürü.	38
Şekil 3.6. Her bir blastosistin görüntülenmesi için hazırlanan preparatlar.	40

Şekil 3.7. Zeiss marka mikroskopta ZEN yazılımı ile aşamalı olarak farklı slaytlar üzerinde blastosist hücrelerinin (yeşil daireler) işaretlenerek (kırmızı noktalar) sayımı.	40
Şekil 4.1. Preimplantasyon gelişiminde a) hücresel bölünmeler ve b) blastosistler	46
Şekil 4.2. Gelişimsel farklılıklar a) Zigotların bölünme oranları, b) 8. Günde blastosist oranları.....	47
Şekil 4.3. CRISPR uygulanmış deney grubunda ve uygulanmamış kontrol grubunda blastosistlerin çekirdek boyası ve farklı antikorlarla boyanarak hücre sayılarının belirlenmesi.....	50
Şekil 4.4. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin toplam hücre sayıları.....	52
Şekil 4.5. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin ICM (SOX2+) hücre sayıları.....	53
Şekil 4.6. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin TE (GATA3+) hücre sayıları.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sığır <i>in vitro</i> embriyo üretim etkinliği (Niemann ve Wrenzycki 2018).	6
Çizelge 2.2. Sığır oositlerini değerlendirmede kullanılan kriterler (Gordon 2003).	10
Çizelge 2.3. Sığır oosit seçimi için Beltsville kriterleri (Hawk ve Wall 1994).	10
Çizelge 2.4. İmmatür oositlerin kumulus dağılımına göre sınıflandırılması (Cetica vd. 1999).	11
Çizelge 2.5. Programlanabilir gen düzenleme yöntemlerinin karşılaştırılması (Petersen 2018).	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, marka ve özellikleri ve kullanım amaçları.	25
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar, marka/özellikleri ve kullanım amaçları.	27
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kitler, marka/özellikleri ve kullanım amaçları.	27
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer antikorlar, marka/özellikleri ve kullanım amaçları.	28
Çizelge 3.5. Tyrode's medyum çözeltisinin hazırlanması.	29
Çizelge 3.6. Yıkama medyumu (STL ve STL-BSA) bileşenleri.	29
Çizelge 3.7. Tyrode's medyum üzerine eklenen çözeltiler.	30
Çizelge 3.8. STOK A çözeltisinin bileşenleri.	30
Çizelge 3.9. STOK B çözeltisinin bileşenleri.	31
Çizelge 3.10. STOK C çözeltisinin bileşenleri.	31
Çizelge 3.11. STOK D çözeltisinin bileşenleri.	31
Çizelge 3.12. SOF kültür medyumu bileşenleri.	31
Çizelge 3.13. Boyamalarda kullanılan primer antikorlar.	39
Çizelge 3.14. Boyamalarda kullanılan sekonder antikorlar.	39
Çizelge 3.15. DNA kütüphanesi oluşturmak için 1. aşama PCR karışımı.	41
Çizelge 3.16. DNA kütüphanesi oluşturmak için 1. aşama PCR koşulları.	41
Çizelge 3.17. İndeks PCR'da kullanılan primer dizileri.	43
Çizelge 3.18. DNA kütüphanesi oluşturmak için ikinci aşama indeks PCR bileşenleri.	43
Çizelge 3.19. DNA kütüphanesi oluşturmak için ikinci aşama indeks PCR koşulları.	43
Çizelge 4.1. Analiz edilen embriyolarda belirlenen genotiplerin oranı.	51

Çizelge 4.2. Genotipleme sonucunda elde edilen farklı allel örnekleri	51
Çizelge 4.3. Farklı genotiplere ait toplam, ICM ve TE hücre sayıları.	52



1. GİRİŞ

İnsan nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 10 milyar olacağı tahmin edilmektedir. Bu nüfus artışına paralel olarak besin ihtiyacı sürekli artış göstermektedir. Ancak besin ihtiyaçlarının geleneksel tarım sistemleri ile yeterince karşılanamayacağı öngörülmektedir (Hackett vd. 2014; Hoekstra ve Wiedmann 2014). En önemli besin kaynaklarımızdan biri olan sığırlar Dünya kırmızı et üretiminin yaklaşık %77,1'ni (Anonim 2021a) ve süt üretiminin %81'ni (Anonim 2022) karşılamaktadır. Bu sebeple, yeterli sayı ve yüksek verimli sığır popülasyonlarının ıslahı ve verimin artırılması büyük önem taşımaktadır.

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) geliştirilinceye kadar çiftlik hayvanlarının verimlerini artırabilmek için geleneksel yetiştirme ve ıslah yöntemleri kullanılmaktaydı. Ancak hem günümüz tüketici beklentilerinin karşılanmasında hem de değişen çevre koşulları ve hastalıklara dirençli genotiplerin geliştirilmesinde artık YÜT gibi biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz olmuştur.

In vitro ve *in vivo* embriyo üretimi, embriyo transferi ve hücre kültürü teknikleri gibi moleküler yöntemler ile desteklenerek yapılan ıslah çalışmaları, önemli ölçüde zaman ve emek tasarrufu sağlamaktadır. Özellikle sığırlarda ıslah çalışmaları klasik yöntemlerle oldukça uzun zaman gerektirmektedir. Tarımda ileri ülkeler bu alanda önemli mesafeler kaydetmiştir. Ancak, ülkemiz yerli sığır ırklarının ıslahında henüz istenilen seviyelere gelemediğinden dolayı mevcut çiftlik hayvanı materyalleri ile üretim de yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı ihtiyaç duyulan hayvanlar ithal edilerek kapatılmaya çalışılmaktadır. Bununla beraber, kaliteli damızlık hayvan genetik materyalinin yerli kaynaklarla temininde ülkemiz henüz istenilen seviyenin gerisindedir. Bu durum Türk tarımında bugün ve gelecekte en önemli darboğaz olarak değerlendirilmektedir. Türkiye için önemli ürünlerde yüksek verim, kalite ve dayanıklılık gibi konularda ıslah hedeflerine yönelik projeler yürütülmesi (Anonim 2023) bilim politikalarımız arasında olmasına rağmen, gelecekte daha da artacağı öngörülen bu dışa bağımlılıktan kurtulmak için bir seçenek olarak moleküler biyoloji ve transgeniklerle ilgili insan kaynaklarını ve temel araştırma altyapısını geliştirmek ve moleküler ıslah konularına daha fazla önem vermek gerekmektedir.

Gen/genom düzenleme (modifikasyon) yöntemleri hayvansal verimin artırılması ve hastalıklara karşı direnç oluşturulması konularında önemli katkılar sağlama potansiyeli taşımaktadır (Vince 2014). Etkili ve doğru genom manipülasyonunu mümkün kılan genom düzenleme araçları; et, süt, yumurta, yapağı gibi verim özelliklerinin geliştirilmesi ve kalitesinin artırılmasında, hastalıklara direnç, çevreye uyum kabiliyeti, döl verimi gibi özelliklerin geliştirilmesinde, yemden yararlanma oranının artırılmasında, çeşitli hastalıklara eğilime sebep olan etmenlerin elimine edilmesinde, kalıtsal hastalıkların tedavisinde veya bu hastalıkların döllere aktarımının önlenmesinde kullanılabilmesi açısından uzun bir süreç isteyen klasik ıslah yöntemlerine bir alternatif olarak düşünülebilir (Vince 2014; Çıldır ve Özmen 2018).

Gen dizilerine özgü endonükleazların ve özellikle CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik*

Tekrar Kümeleri) teknolojisinin keşfedilmesiyle, çiftlik hayvanları üzerinde yapılabilecek çalışmaların sayısı hızla artmaktadır (Çıldır ve Özmen 2018). Belirli genlerin DNA dizilerinin silinerek susturulması (KO) veya ekleme yapılarak değiştirilmesi (KI) yoluyla bir genin hücreye veya zamana bağlı olarak nasıl çalıştığını çözümlmek ve böylece belirli bir hedef doğrultusunda gen ifadesini nasıl değiştireceğimizi anlamak mümkün olabilir. Böylece bir gen ürününün belirli bir süreç üzerindeki rolünü saptamak olanaklı hale gelebilir (Tschaharganeh vd. 2016, You vd. 2020). Bu anlamda, çiftlik hayvanı türlerinde genom modifikasyonunun yapılabilir olması, birçok alanda araştırma konularının şeklini değiştirmeyi, tanımlayıcı ve korelasyonel yaklaşımlardan deneysel araştırmaya geçmeyi sağlamıştır. Moleküler biyolojideki son gelişmeler sığır embriyogenezinin mekanizmasını incelemek için yeni yöntemler kazandırmıştır. Bununla beraber, CRISPR gen düzenleme teknolojilerinin son 10 yılda süregelen mükemmelliği sayesinde kararlı ve hedefli KO mutantlar üretme yeteneği oluşmuştur. CRISPR kullanılarak doğrudan KO mutant üretimi, zigot aşamasından itibaren susturulmasının (ablasyonun) sınırlandırılmasına izin verdiği için embriyo gelişiminin moleküler yönlerini aydınlatmayı amaçlayan deneylerde kullanımı açısından özellikle avantaj sağlamaktadır (Lamas-Toranzo vd. 2018).

Hayvan yetiştirme ve ıslahında kullanılan yardımcı üreme teknikleri arasında güncel bir konu olan CRISPR ile genlerin manipüle edilmesi, sağlıklı embriyo oluşumu ve gebeliğin sürdürülebilirliğinin düzenlenebilmesi bu alanda yeni bir çığır açmıştır. Preimplantasyon embriyonunun gelişimini kontrol eden süreçlerin anlaşılması sığırlarda üreme fonksiyonunun optimizasyonu ve yeni üreme teknolojilerinin kullanılması açısından önemlidir.

Geçtiğimiz yıllarda, sığır embriyolarının *in vitro* üretimi (IVP) önemli ölçüde iyileştirilmiştir ve özellikle sığır IVP artık arazi koşullarında bile yaygın olarak uygulanmaktadır. Günümüzde, dünyada üretilen embriyoların büyük bir çoğunluğunu *in vitro* koşullarda üretilen embriyolar oluşturmaktadır (Anonim 2021b). Bu *in vitro* teknik, özellikle süt endüstrisindeki sığır üreticilerine kısırlığın üstesinden gelmek ve genetik değeri yüksek hayvanların yayılmasını artırmak için yeni fırsatlar sunmaktadır. Ovum toplama (OPU: Ovum pick-up) ve IVP'deki iyileştirmeler, büyük ölçekli uluslararası ticarileştirmeye sonuçlanmıştır ve yılda yarım milyondan fazla IVP embriyosu üretilir olmuştur (Kawamoto vd. 2019). Ayrıca, bu ilerlemeler sığır ve insan preimplantasyon gelişiminin dikkate değer ölçüde benzer olduğu gerçeği ile insanlar da dahil olmak üzere erken memeli embriyogenezini incelemek için bir model sistem olarak sığır embriyolarının kullanılmasına yol açmıştır.

Preimplantasyon gelişimini anlamamanın önemi, sığırlarda YÜT kullanımının yaygınlaşmasıyla daha da artmıştır. YÜT'ün kullanımı, ekonomik açıdan değerli özellikler için ıslah edilmiş genetik değeri olan yavruların üretilmesi açısından da önemlidir (Thomassen vd. 2016; Kaniyamattam vd. 2017). Ayrıca, embriyo transferi döl tutmama sendromu (RBS: repeat breeder syndrome) ve ısı stresine maruz kalan ineklerde gebelik oranlarını artırmak için de kullanılabilir (Hansen 2014). Sığırlar da YÜT'ün ekonomik açıdan oldukça başarılı olduğu gösterilmiş olsa da (Thomassen vd. 2016), tam olarak optimize edilememiştir. Ayrıca, preimplantasyon düzenleyici kilit

mekanizmalar gibi bazı önemli süreçler hakkında bilgi eksikliği vardır. Bunlar, *in vitro* embriyonik ölüme sebep olan anormal gen ekspresyonu (Driver vd. 2013), değiştirilmiş bir metilom (Niemann vd. 2010) ve daha yüksek lipid içeriği (Crosier vd. 2001) gibi anormalliklerle vurgulanmaktadır.

Sığırlarda, tohumlamanın yedinci gününden sonra embriyoların %20-50'sinde (Sartori vd. 2010; Wiltbank vd. 2016) ve blastosist aşamasına ulaşabilen embriyoların yaklaşık %25'inde gebelik sırasında ve doğumdan önce kayıp yaşandığı bildirilmiştir. Bu kayıpların yaklaşık %30'u 8. ve 27. günlerde arasında meydana gelir. Yaklaşık %12'si 28-60. günler arasında ve %2'si ise 60-90. günler arasında olduğu bildirilmiştir (Wiltbank vd. 2016). Bu olumsuzlukların giderilmesi için tohumlamadan sonraki 7. günde blastosist aşamasında gelişimle ilgili süreçlerin net bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Sığırlarda embriyo gelişiminin ilk aşamalarında blastosist oluşumu ile eş zamanlı olarak ilk hücre soyu farklılaşması olan trofektoderm (TE) ve iç hücre kütlesi (ICM) meydana gelmektedir. Blastosist aşamasındaki embriyolarda meydana gelen kayıpların sebeplerinin anlaşılmasına yardımcı olabilecek bilginin üretilmesi bu tez projesinin konusunu oluşturmuştur. Böylece, embriyo gelişimi sürecinde etkili olan faktörlerin doğru bir şekilde anlaşılması ve gelişimsel başarısızlıkların kökenlerinin belirlenmesine yardımcı olunması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, CRISPR/Cas-9 aracılı KO-CDX2 geninin sığır preimplantasyon gelişimindeki rolü araştırılmış ve blastosist oluşumu için CDX2 geninin etkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Bu amaca ulaşmak için CDX2 geni ekzon-1 hedeflenerek rehber RNA'lar (guide RNA) tasarlanmış, mikroenjeksiyon yolu ile mature (Metafaz II aşamasındaki olgun) oositlere verilmiştir. Blastosist aşamasına gelişen embriyolarda, KO durumlarını belirlemek için immünohistokimyasal boyamalar ve genotipleme yapılarak hem gelişimsel hem de morfolojik değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, CDX2 geni bakımından KO mutant ve kontrol embriyolar karşılaştırılarak blastosist aşamasındaki embriyolarda CDX2 geninin elzem olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca farklı türlerde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında memeli türleri arasında embriyo gelişiminin ilk hücre soyu farklılaşmasının aynı olmadığı anlaşılmıştır. Bu bulgulara dayanarak, yardımcı üreme teknikleri ile üretilen sığır embriyolarında meydana gelen kayıpların nedenlerinin tam olarak belirlemek için bu süreçte yer aldığı düşünülen aday genlerin incelenmesi gerekli olduğu söylenebilir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Üreme (Reprodüktif) Biyoteknolojisi

Biyoteknoloji, canlı organizmalardan elde edilen ürünleri değiştirmek veya geliştirmek için kullanan araçların tümü ve bir bilim dalı olarak tanımlanabilir. Canlı türlerin gelişimi, üreme oranı ve hayvansal üretimin artırılması çalışmalarında biyoteknolojinin büyük etkisi bulunmaktadır. Üreme biyoteknolojisi, hayvansal ürünlerin kalitesini geliştirmek ve artırmak için biyolojik sistemleri kullanan modern teknolojidir. Bu anlamda üreme biyoteknolojisinde yaygın olarak embriyo transferi, *in vitro* embriyo üretimi, suni tohumlama, spermin kısa ve uzun süreli korunması (kriyoprezervasyon), sperm cinsiyeti, senkronizasyon, süperovülasyon kullanılmaktadır (Qamar vd. 2015).

2.1.1. Embriyo transferi

İlk memeli embriyo transferi (ET) 100 yıldan daha uzun bir süre önce yapılmış olmasına rağmen, ticari sığır embriyo transferi 1970'lerin başında Avrupa sığır ırklarının Kuzey Amerika'ya ithal edilmesiyle ortaya çıkmıştır (Betteridge 2003; Seidel Jr 1981). Bu tarihten itibaren ticari sığır embriyo transferi tüm dünyada artmıştır. 2016 yılında yaklaşık bir milyon sığır embriyosunun transfer edildiği ve binlerce embriyonun uluslararası olarak nakledildiği bilinmektedir (Niemann ve Wrenzycki 2018). *In vivo* türevli sığır embriyoları, belirli patojenlerden arındırılabilen yıkama prosedürleri sayesinde hayvan genetiğini dünya genelinde yaymak için ideal bir araçtır. Embriyo transfer tekniklerinde yıllar içerisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu sayede, yeni yöntemler ovaryum fonksiyonunu kontrol etmeye yardımcı olurken donörlerin süper ovülasyonunu ve alıcıların senkronizasyonunu kolaylaştırarak cerrahi olmayan prosedürlerin çiftlik hayvanlarında embriyo transferinde kullanılmasını sağlamıştır. Sığır embriyo transferi donörlerin ve alıcıların seçilmesini, yönetilmesini, tedavi edilmesini ve embriyoların kızgınlıktan 6-8 gün sonra toplanmasını ve transferini içerir (Niemann ve Wrenzycki 2018).

Embriyo transferinin avantajları ve dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanmıştır (Ciornei 2021).

Avantajları:

- Değerli hayvanların küçük populasyonları oluşturulabilir (Selk 2002, Sethi vd. 2021).
- Hayvanların genetik olarak gelişimine yardımcı olur, nesil aralığını kısaltır, seleksiyon yoğunluğunu artırır (Gengler ve Druet 2001).
- Yaşamı boyunca doğal olarak üretilebilen birkaç buzağıya kıyasla, genetik olarak üstün tek bir dişiden daha çok buzağı elde edilmesine yardımcı olur.
- AI'da kullanım için sınırlı sayıda üstün dişiden damızlık boğa üretmek mümkündür (Mapletoft 1985).
- Safkan sürü sayısı artırabilir.

- Hastalık, yaralanma veya yaş nedeniyle infertil hale gelen genetik olarak değerli dişiden yavru elde etmek mümkündür (Seidel ve Seidel 1981).
- Kriyoprezervasyonun gelişmesi ve teknolojilerin ilerlemesi ile canlı hayvanlar yerine embriyoların taşınması (ithal/ihracat) ekonomik ve daha kolaydır.
- Nesli tükenmekte olan hayvanlar embriyo üretimi ve kriyoprezervasyon teknolojileri sayesinde kurtarılabilir (Dresser 1988).
- Hastalıkların ve genetik kusurların enfekte donörlerden yavrularına bulaşması önlenabilir (Mapletoft 1985).
- Enfeksiyöz ajanların bulaşma riskini azaltır. Sığır lösemi virüsü (BLV), mavi dil virüsü (BTS) ve şap hastalığı (FMD) virüsü taşıyan ineklerden toplanan embriyo, etkilenmemiş alıcılara transfer edilmeden (Tripsin tedavisi) önce uygun şekilde yıkanması ile hastalık bulaştırması önlenabilir.
- ET, normal ve anormal fertilizasyon arasında ayırım yapılmasına izin verir (Gordon 2017).
- Hastalık kontrolü, değerli hayvanların genetik iyileştirilmesi, biyogüvenlik programı ve yeni hayvan hatlarının/ırklarının geliştirilmesi için önemli bir araçtır (Pickles 1987).
- Embriyo bölme, embriyoların cinsiyetlendirilmesi, klonlama ve transgenез gibi üreme ilişkili teknolojiler, ET'nin geleceğini daha da genişletmektedir (Mapletoft ve Hasler 2005).
- Elit boğa sperması kullanılarak üstün donörlerden ET tarafından üretilen erkekler, AI uygulamalarında geleceğin seçkin babaları olarak kullanılabilir ve üretilen dişiler, geleceğin boğa annesi olarak hizmet eder. Bu nedenle, özellikle sığır ve manda yetiştirme programlarında seçkin boğaların mevcut talebi büyük ölçüde karşılanabilir (Pickles 1987).
- Geriatrik hayvanlarda yaşlanan oositin üremedeki azalmaya katkısını değerlendirmek için kullanılabilir (Gordon 2017).
- Kısırlık tedavisi, ET ineklerde kısırlık tedavisinde önemli bir araç olarak hizmet eder.

Dezavantajları:

- Maliyet engelleyici olabilir ve başarı oranları suni tohumladan daha düşüktür.
- Alıcı dişilerin maliyeti ve bakımı zordur.
- *In vivo* kökenli embriyoları üreme sisteminden temizleme becerisine sahip bir teknisyen gerektirmektedir.
- Alıcılar aracılığıyla hastalığın olası yayılması mümkün olabilir.

In vitro üretim etkinliği ile ilgili olarak (Çizelge 2.1) immatür sığır oositlerinin yaklaşık %80-90'ı *in vitro* nükleer olgunlaşmaya, yaklaşık %80'i döllenmeye, %30-40'ı blastosist aşamasına geçer ve transfer edilen embriyoların yaklaşık %50'si bir gebelik oluşturur ve gebeliği sürdürebilir (Galli vd. 2014; Lonergan ve Fair 2016; Wrenzycki vd.

2007). *In vivo* ve *in vitro* orijinli oositlerin ve erken sığır embriyolarının temsili resimleri Şekil 2.1’de gösterilmektedir (Niemann ve Wrenzycki 2018).

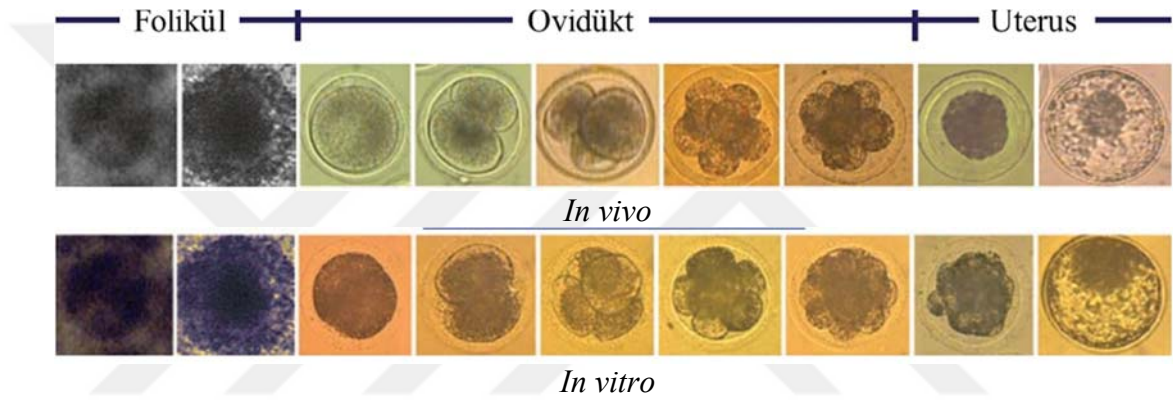
Çizelge 2.1. Sığır *in vitro* embriyo üretim etkinliği (Niemann ve Wrenzycki 2018).

Maturasyon Oranı*	%90
Fertilizasyon Oranı*	%75-80
Bölünme Oranı*	%60-70
Blastosist Oranı*	%30-40
Gebelik Oranı**	%50-60
Doğum Oranı***	%70-90

*Mature olmayan oosit sayısı üzerinden hesaplanır

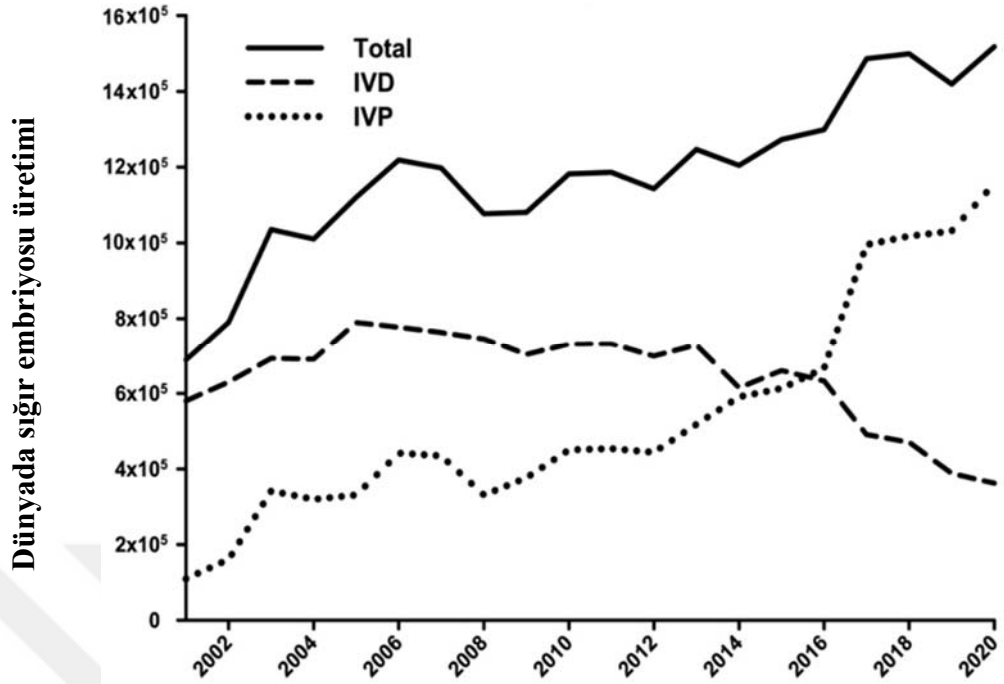
**Embriyo transferi başına hesaplanan

***Gebelik başına hesaplanan



Şekil 2.1. *In vivo* ve *in vitro* şartlarda oosit ve embriyo gelişimi (Niemann ve Wrenzycki 2018).

Uluslararası Embriyo Teknolojisi Derneği (IETS) istatistiklerine göre (Anonim 2021b) son 20 yılda (2001-2020) *in vivo* kökenli (IVD) embriyo kullanımı azalırken *in vitro* üretilmiş (IVP) embriyo kullanımında hızlı bir yükseliş görülmektedir (Şekil 2.2). Dünya çapında üretilen toplam embriyo sayısı içerisinde *in vitro* embriyoların sayısı 2012 yılından beri sürekli bir artış göstermektedir. Buna paralel olarak *in vitro* üretilen ve alıcılara transfer edilen embriyo (taze veya dondurulmuş-çözdürülmüş) sayısı artış göstermekte olup, günümüzde süperovülasyon ile *in vivo* üretilen embriyo sayısını aşmıştır. Bu, IVP'nin güvenilir ve uygun maliyetli teknik olarak kabul edildiğini ve sığır yetiştiriciliğinde önemli bir rol kazandığını göstermektedir.

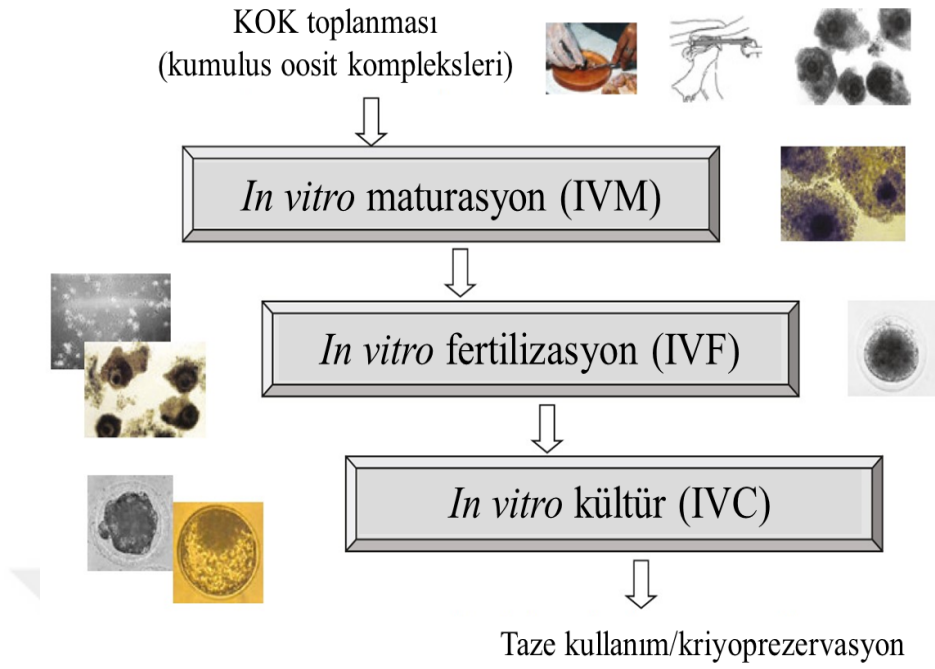


Şekil 2.2. 2001-2020 döneminde kaydedilen sığır embriyolarının sayısı (*in vivo* türetilmiş, *in vitro* üretilmiş ve toplam).

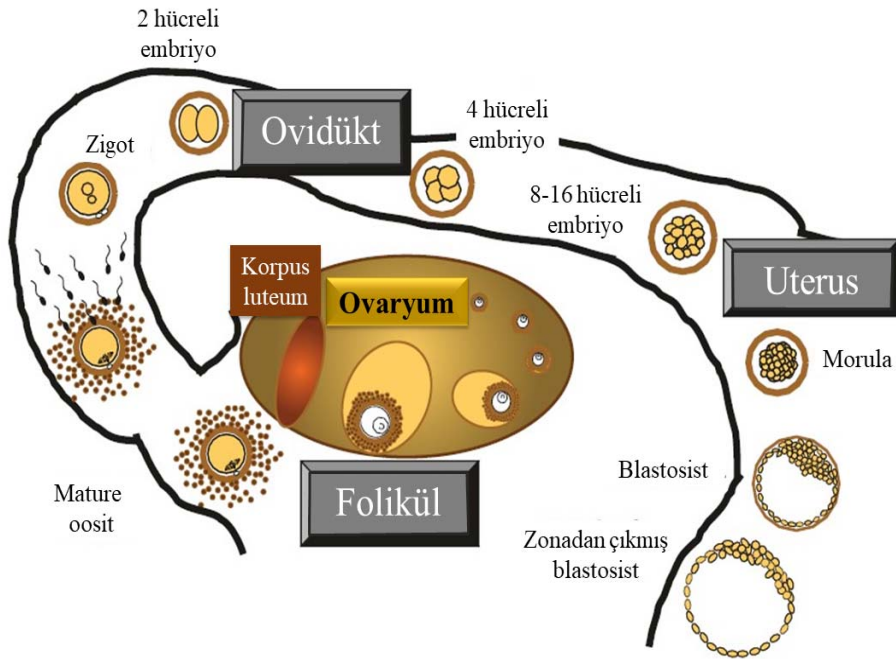
2.1.2. *In vitro* embriyo üretimi

In vitro embriyo üretimi sayesinde genetik üstünlüğe sahip damızlıklardan daha fazla yavru almak mümkündür. Böylece üstün genotipe sahip bireylerden oluşan sığır popülasyonlarından yetiştirilmedi daha kolay ve hızlı olmaktadır (Camargo vd. 2006).

In vitro embriyo üretimi; *in vitro* maturasyon (IVM), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve *in vitro* kültür (IVC) içeren üç aşamalı bir süreçtir (Şekil 2.3). Oosit büyümesi, olgunlaşması, yumurtlama, döllenme ve yumurta kanalı içindeki erken embriyonik gelişim sırasında meydana gelen ve sonunda uterusu girmiş olan blastosiste yol açan süreçler Şekil 2.4'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. *In vitro* embriyo üretim aşamaları (Niemann ve Wrenzycki 2018).



Şekil 2.4. Erken embriyonik gelişimin (preimplantasyon) şematik gösterimi (Niemann ve Wrenzycki 2018).

2.1.2.1. *In vitro* maturasyon

In vitro maturasyonda başarının artırılması için kullanılan oositlerin sayısı ve kaliteli olması önemlidir. Bu nedenle bu aşamada kullanılan farklı oosit toplama yöntemleri, oositlerin kalite parametreleri, *in vivo* oosit maturasyonu ve maturasyona etki eden faktörler aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

Oositlerin temel kaynağını mezbahalardan alınan ovaryumlar oluşturmaktadır. Mezbahe materyalinden oositlerin elde edilmesi amacıyla farklı yöntemler kullanılabilir. Bu tez çalışmasında oosit toplama yöntemi olarak folikül aspirasyon kullanılmıştır.

Ovaryumlardan folikül aspirasyon yöntemi, çok fazla sayıda ovaryum bulunması durumunda tercih edilmektedir. Bu yöntemde ovaryum üzerindeki foliküllerden oositlerin aspirasyonu için özel olarak hazırlanmış vakum pompalı aspiratörler veya ucuna 18 G kalınlıktaki iğne takılan 5-10 ml'lik enjektörler kullanılmaktadır (Gordon 2003). Uygulanmasının kolay ve çok sayıda ovaryumun işlenebilmesine olanak vermesi bakımından avantajları nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem ile ovaryum başına 8-12 adet oosit toplandığı ve bunların %45-50 kadarının gelişime uygun kalitede olduğu bildirilmiştir (Katska ve Smorak 1984). Aspirasyon ile elde edilen folikül sıvısı petrilere (90 mm çapında) içerisine konularak oositler, stereo mikroskop altında sınıflandırılır (Akyol 2005). Aspirasyon yönteminde elde edilen oosit sayısının artırılmasına yönelik olarak Arav (2001) tarafından transilluminasyon aspirasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde kortikal folikülleri görüntülemek için, ovaryumun medulla ve korteksine ışık kaynağı yerleştirilmektedir. Bundan dolayı ışık geçirgen (transilluminasyon) aspirasyon yöntemi (TAO: Transillumination-Aspiration Ovary) denilmektedir. Bu yöntem ile ovaryum başına elde edilen oosit oranının %50 oranında artırılabilir olduğu bildirilmiştir (Arav 2001; Gordon 2003).

Oositler onları destekleyen kumulus hücreleri (granüloza ve teka hücreleri) ile çevrilidir. Kumulus hücreleri mayotik dinlenme süreci içinde oositin ihtiyaçlarının karşılanmasına, maturasyona başlayan oositlerin gelişim yeteneği kazanmasına yardımcı olmaktadır. Bu hücreler ve oosit parakrin, otokrin hormonlar ve büyüme faktörleri sayesinde dolaylı olarak ilişki halindedirler. Ayrıca kumulus hücreleri ile oosit, özel bir bağlantı sistemi aracılığıyla doğrudan bağlantı halindedir. Kumulus hücreleriyle birlikte oosite kumulus oosit kompleksi (KOK) denilmektedir (Takashi 1998). *In vitro* embriyo üretiminde iyi kaliteli oositlerin seçimi ve sınıflandırılması yüksek başarı oranı sağlanmasında önemlidir. Aspirasyon ile elde edilen oositler morfolojik olarak değerlendirilmektedirler.

Morfolojik olarak sınıflandırmada oositin sitoplazma görüntüsüne ve oositi çevreleyen hücrelerle olan bağına dikkate edilmektedir. Görünümü homojen olan bir sitoplazma, oositi çevreleyen, bozulmamış ve kompakt yapıda kumulus hücreleri, mature olmayan (immatür) oositlerin maturasyon ve embriyonik gelişimlerin en önemli işaretlerindendir (Kanagawa 1995; Boni vd. 2002). Farklı araştırmacılar tarafından oositleri sınıflandırma şemaları oluşturulmuştur. Bu sınıflandırılmalarda oositin

yoğunluğu, çevresindeki kumulus hücrelerinin sayısı ve diğer bazı morfolojik faktörler önemlidir (Shioya vd. 1988; Madison vd. 1992). Bazı araştırmacılara göre oositler, kumulus hücreleri ve oositin sitoplazması ile birlikte değerlendirmeye alınır ve dört farklı sınıflandırma yapılır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Sığır oositlerini değerlendirmede kullanılan kriterler (Gordon 2003).

Kategori	Kumulus oosit kompleksi özellikleri
1	Kumulus çok katmanlı ve kompakt, sitoplazması homojen, kumulus oosit kompleksi (KOK) açık ve şeffaf.
2	Kumulus yapısı çok katmanlı, sitoplazması homojen, kalın görünüm ve zonada koyulaşma, KOK daha koyu ve daha az transparan.
3	Kumulus yapısı oldukça az katmanlı, sitoplazma düzensiz ve koyu kümelenmelere sahip, KOK 1 ve 2.'ye göre oldukça koyu.
4	Kumulus hücreleri genişlemiş ve dağınık, sitoplazma düzensiz, KOK koyu ve düzensiz.

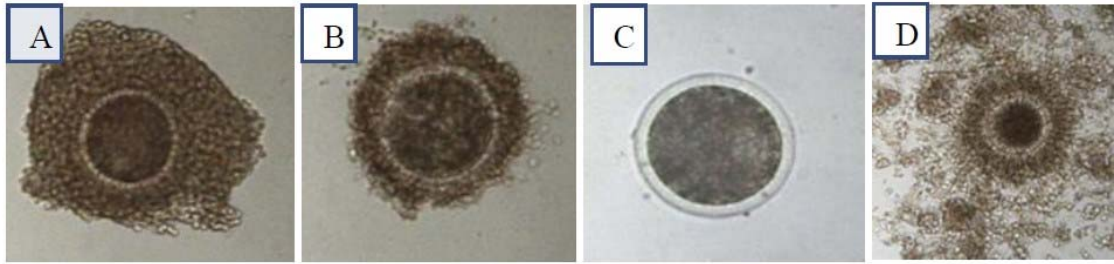
Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyon için seçiminde bazı temel görsel morfolojik değerlendirmeler yapılmaktadır. Mikroskop eşliğinde, oositlerin sınıflandırma şemaları oluşturulmuştur. Bu şemada; oositin sitoplazma yoğunluğu, oosit çevresindeki kumulus hücrelerinin yoğunluğu ve görülebilir bazı morfolojik özellikler yer almaktadır (Çizelge 2.3). Ayrıca immatür oositler, kumulus hücrelerinin dağılımına göre A, B, C ve D olarak sınıflandırılmaktadır (Cetica vd.1999). Bu sınıflandırmadaki oositlerin özellikleri Çizelge 2.4'te, örnek görüntüleri ise Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Sığır oosit seçimi için Beltsville kriterleri (Hawk ve Wall 1994).

Oosit Tipi	Kumulus Özellikleri	Sitoplazma Özellikleri
İyi kalite	Çok katlı kumulus ve sitoplazma net görülebilir	Yoğun ve ince granüllü
Orta ve vasat kalite	Birkaç katlı ya da yarısından daha azı kompakt kumulus ile kaplı ve net görünmeyen sitoplazma	Değişebilen yoğunlukta, küçük ve orta büyüklükte granüllü
Kalitesiz	Kısmen ya da tamamen genişlemiş kumulus, hücresiz ve kumulussuz iskelet, aşırı büyük veya küçük oosit.	Kalın granüller çok açık ve çok koyu alanlarda dağılmış, sitoplazma açık kahve ya da siyah, düzensiz oosit

Çizelge 2.4. İmmatür oositlerin kumulus dağılımına göre sınıflandırılması (Cetica vd. 1999).

Kalite	Özellikleri
A	Kumulus hücreleri zonanın çevresinde 5 veya daha fazla katlı olarak görülmektedir.
B	Kumulus hücreleri zona çevresinin 1/3'ünden fazlasını 2 veya daha az kat olarak kaplamaktadır ya da az bir kısmında kumulus olmayabilir.
C	Oositler genellikle tamamen çıplak ya da B kalite oositten çok daha az kumulus hücrelerine sahiptir.
D	Kumulus hücreleri örümcek ağı gibi ya da şişmiş gözükmemektedir



Şekil 2.5. İmmatür oositlerin kalite kriterlerine göre sınıflandırılması (Hasler vd. 2017).

Sağlıklı bir şekilde embriyonik gelişimin tamamlanabilmesi için gerekli olan kaliteli oosit hücrelerinin elde edilmesinde en önemli basamak maturasyondur. Blastosist implantasyonundaki görülen başarısızlıklar ve fetal gelişimdeki anomaliler çoğunlukla bu basamaktaki aksaklıklardan köken almış olabilmektedir. Bir örnek sitoplazma topluluğu elde etmek için uygulanan yöntem sığır, koyun, keçi, domuz gibi çiftlik hayvanlarında oositinin *in vitro* maturasyonudur. Bu türlerde oosit hücreleri kolaylıkla mezbaha ovaryumlarından elde edilebilmektedir. *In vitro* maturasyon olgusu adından da anlaşılacağı gibi oositin gelişimini taklit etmek üzere planlanan bir süreçtir. Uygun maturasyon şartları sağlanmadığı takdirde *in vitro* embriyo üretim başarısı mümkün değildir. Bu nedenle, bu sürecin en iyi şekilde taklit edilmesi için oositin fertilize olana kadar geçirdiği süreçte ne gibi aşamalardan geçtiğini çok iyi anlamak gerekmektedir. Bu bağlamda bu sürecin *in vivo* olarak nasıl gerçekleştiği aşağıda detaylandırılmıştır.

Memelilerde primer oosit pubertaya (erginliğe) ulaşana dek mayoz bölünmenin profaz-I aşamasında ve diploten yapıda duraksama halindedir. Pubertaya ulaşılması ile gonadotropik hormon (GnRH), maturasyon faktörü (MPF), Camp siklin gibi uyarıcıların salgılanmayla başlamasıyla birlikte duraksama sona erer ve mayoz bölünme devam eder.

Bilindiği gibi oosit toplama tekniği ne olursa olsun *in vitro* üretim için gerekli olan oositler ovaryumlardan elde edilmektedir ve bu oositler henüz döllenme yeteneklerini kazanmamışlardır. Maturasyon, oositin mayoz bölünme sırasında profaz-I evresinden

metafaz-II (MII) evresine kadar olan olaylar bütünü olarak kabul edilmektedir (Anwar ve Moussa 2002; Sela-Abramovich vd. 2006; Akyol 2008; Grøndahl 2008). Bu süreç nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak 2 kısımda incelenmektedir. Bu iki maturasyon sonrası oosit döllenme yeteneği kazanmaktadır.

Oosit gelişiminin düzenlenmesi ve kontrolü, hem lokal (parakrin) hem de yumurtalık dışı (endokrin) faktörleri kapsayan kompleks bir süreçtir. Yumurta gelişiminin düzenlenmesinde hormonların yanı sıra (LH: Luteinleştirici Hormon, FSH: Folikül Uyarıcı Hormon), büyüme faktörleri, sitokinler, inhibin/aktivin gibi faktörler kritik önem taşımaktadır. Üreme sisteminde, hormonlar ve büyüme faktörleri yakın ilişki içindedir. Büyüme faktörleri; yumurtalıklarda somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamalarında embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedir.

Sığır embriyolarının *in vitro* üretiminde kullanılan kültür medyumları basit ve kompleks olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Gordon 2003). Basit maturasyon medyumları genellikle bir piruvat, laktat ve glikoz ilavesiyle birlikte bazik fizyolojik salin içeren bikarbonat tamponlu ortamlardır. Basit ortamların çeşitli biçimleri arasındaki temel farklar, iyon konsantrasyonlarındaki ve enerji kaynaklarının seviyelerindeki farklılıklarda yatmaktadır. Ortam genellikle eser miktarda antibiyotik (penisilin, streptomisin, gentamisin) içeren serum veya albümin ile desteklenmektedir.

Kompleks maturasyon medyumları ise basit ortamların temel bileşenlerine ek olarak amino asitler, vitaminler, pürinler ve esas olarak serumda bulunan diğer maddeleri içermektedir (Akyol 2006). Bikarbonat veya 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) ile tamponlanmış ve çeşitli serum ve/veya gonadotropin ve/veya steroid (östradiol-17b) hormonları ile takviye edilmiş doku kültür medyumları (TCM-199), sığır oosit olgunlaşması çalışması için en yaygın kullanılan kültür ortamı olmuştur. Ham's F-10, Menezo-B2 mediumu ise kompleks maturasyon medyumlarına verilecek diğer yaygın örneklerdir (Brackett vd. 1989; Liu vd. 1991). Bu tez çalışmasında TCM-199 medyumları kullanılmıştır.

2.1.2.2. *In vitro* fertilizasyon

In vitro fertilizasyon, mature oositlerin dişi genital kanalının dışında döllenmesidir (Gündoğan 1998). Yöntem, temel bilimler ve uygulamalı bilimlerin alanında çok iyi kurulmuş bir teknolojidir. Embriyo üretimini sağlayan bu teknoloji bilimsel araştırmalarda, insanlarda kısırlık (infertilite) tedavisinde, besi hayvanlarının üretiminin artırılmasında ve nesli tehlike altında olan hayvanların sayısının korunmasında kullanılmaktadır (Bavister 2002).

Kaynağı tam olarak açıklanamamakla birlikte *in vitro* fertilizasyonda ilk başarılı çalışma hamster gametleri ile 1969 yılında yapılmıştır. Bu çalışmalar spermatozoonun *in vitro* kapasitasyonu ile memeli *in vitro* fertilizasyonunda yapılan ilk çalışmadır (Gordon 1994). Iritani ve Niwa (1977) tarafından sığır oositlerinde ilk başarılı IVM ve IVF Japonya'da yapılmıştır. Bu yöntem ile doğan ilk buzağı ise 1981 yılında elde edilmiştir.

Daha sonra iki IVF buzağısı da 1983 yılında Georgia’da elde edilmiştir (Brackett ve Bousquet 1984).

Ülkemizde ilk başarılı IVF çalışması, 1984 yılında tavşanlarda gerçekleştirilmiştir (Tekeli 1984). Sonraki yıllarda fareler (Kılıçoğlu 1985; Tekeli vd. 1990; Tekeli 1992), ve sığırlar (Birler 1997; Birler vd. 1998) üzerinde de yapılmıştır. IVF ile üretilen ilk yavru, koyunlardan alınmıştır (Birler vd. 2002), ilk buzağı ise 2007 yılında doğmuştur (Akyol vd. 2007).

In vitro embriyo üretim başarısının artırılmasında bir diğer etkili faktör fertilizasyonda kullanılan spermin sağlıklı olmasıdır. Bu nedenle ticari olarak alınan semenden sağlıklı olanların seperasyonu önemlidir. Sperm seperasyon yöntemleri ile morfolojik normal sperm ve ilerleyici hareketliliği artırarak sperm kalitesi önemli ölçüde iyileştirebilir. Bu nedenle IVF’de sperm seperasyon yöntemleri çok önemli bir yere sahiptir. Bu tür spermatozoa seçimi, hareketli spermeleri hareketsiz olanlardan ayırır, seminal plazma kalıntılarını, kriyoprotektif ajanları, diğer arka plan materyallerini ve kalıntıları uzaklaştırır (Zavos 1992) ve aynı zamanda spermin kapasitasyonunu başlatır (Centola vd. 1998).

Sperm seperasyon yöntemlerinden biri olan yoğunluk-gradient santrifüj ile seçici ayırma yapılmaktadır. Hücrelerin, hücre içi partiküllerin ve virüslerin yoğunluk-gradient santrifügasyonu için ve IVF’de ticari bir medyum olan Percoll kullanımı yaygındır (Samardzija vd. 2006). Percoll ile yoğunluk-gradient santrifüj yönteminde kullanılmasıyla bakteri, hücre ve kalıntı partikül gibi yabancı materyaller spermatozadan net bir şekilde ayrılır. Bu avantajlarından dolayı IVF amacıyla boğa spermelerinin seperasyonunda Percoll yaygınlıkla kullanılır (Mendeş vd. 2003). Bununla beraber Percoll’e alternatif olarak boğa spermelerinin seperasyonunda Bovipure kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Bovipure, boğa spermelerinde kullanılmak üzere özel olarak formüle edilmiş bir sperm ayırma ve saflaştırma ürünüdür. Silan ile kaplanmış koloidal silika partikülleri içeren izo-ozmotik tuz çözeltisidir (Samardzija vd. 2006). Bu tez çalışmasında da boğa spermelerinin diğer kalıntılardan temizlenmesi için Bovipure kullanılmıştır.

2.1.2.3. *In vitro* kültür

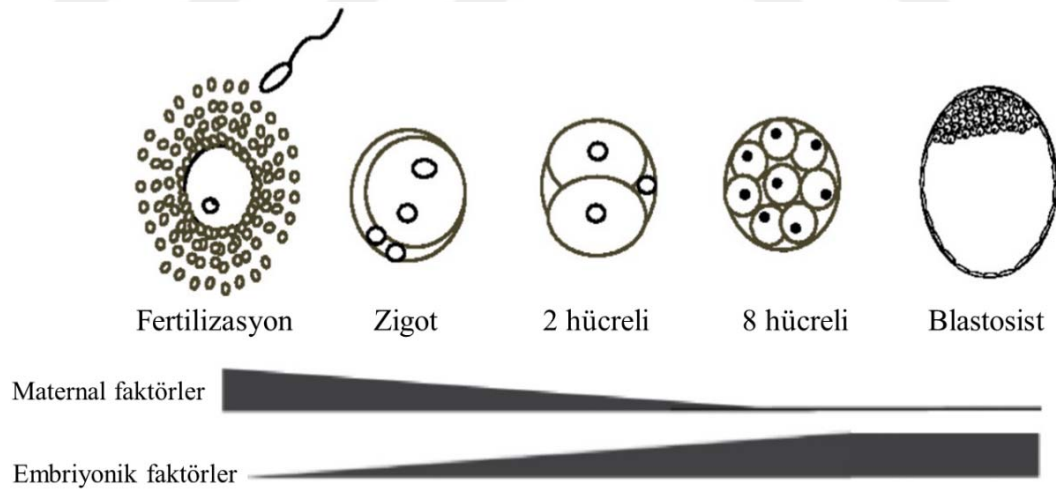
Oositin orijininin blastosist oranını etkilemesinin yanısıra fertilizasyon sonrası kültür koşullarının bu blastosistlerin kalitesini ve canlılığını etkilediği bilinmektedir. Oositin iç (intrinsik) kalitesi blastosist hızının birincil belirleyicisini oluştururken, blastosist kalitesi üzerinde en büyük etkiye döllenme sonrası kültür ortamı sahiptir (Hendriksen vd. 2000; Rizos vd. 2002; Lonergan vd. 2003; Krisher 2004)

Fertilizasyon aşamasını tamamlayan oositler, kumulus hücrelerinden ve spermatozoanlardan yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra gelişmelerini sürdürecekleri *in vitro* kültür (IVC: *in vitro* culture) ortamlarına alınırlar. *In vitro* embriyo kültürü amacıyla 3 farklı sistem kullanılmaktadır. Bunlar sırasıyla; *in vivo* embriyo kültür sistemleri, ko-kültür içeren IVC sistemleri ve tanımlanmış IVC Sistemleridir.

Sığır embriyolarının kültüründe yaygın olarak tanımlanmış IVC kültür sistemleri kullanılmaktadır. IVC sistemlerinde sentetik ovidükt sıvısı (SOF ve SOFaa), Charles Rosencrans (CR1 ve CR1aa) ve Quinn's Advantage (QAM) medyumları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu medyum sistemleri basit bazı farklılıklar dışında genel olarak benzer özelliklere sahiptirler. Ancak etkinlikleri çalışılan laboratuvarlara göre değişiklik gösterirken bunun yanı sıra içerdikleri katkı maddeleri (BSA, FCS, aminoasitler, büyüme faktörleri, antioksidanlar vb.) nedeniyle de *in vitro* embriyo gelişiminde de büyük farklılıklar gösterebilmektedirler (Bavister vd. 1992; Bucak vd. 2010).

2.2. Memeli Preimplantasyon Embriyo Gelişimi

Memelilerde görülen eşeyli üremede gelişimin başlaması fertilizasyon (döllenme) ile tetiklenir. Memelilerin spermallerinde ve oositlerinde nükleer DNA (nDNA) replikasyonu uykudadır. Ancak replikasyon 1 hücreli embriyo veya zigot olarak da adlandırılan fertilize oositte yeniden başlar. Fertilizasyon, biri paternal (baba kaynaklı) kromozomlar için diğeri maternal (anne kaynaklı) kromozomlar için olmak üzere iki pronükleus içeren bir zigot üretir ve hem maternal hem de paternal pronükleus DNA'larını aynı anda çoğaltır. Daha sonra pronükleus ilk mitoz ve sitokinez sırasında birleşerek her hücrenin bir dizi paternal ve bir dizi maternal kromozom içeren tek bir diploid (2n) çekirdek içeren 2 hücreli bir embriyo (zigot) oluşturur (Şekil 2.6). Döllenmeyi takiben embriyo, blastomerlerin transkripsiyonel olarak sessiz olduğu ve yeni protein sentezi için döllenmeden önce oositte depolanan transkriptlere bağlı olduğu bir süre geçirir (Schier 2007; Fair 2010). Anneden köken alan transkriptler embriyoda hızla bozulur (Graf vd. 2014). Embriyonik genom aktivasyonu (EGA), protein sentezi için mevcut olan embriyonik genomdan yeni sentezlenmiş transkriptlerle sonuçlanır.

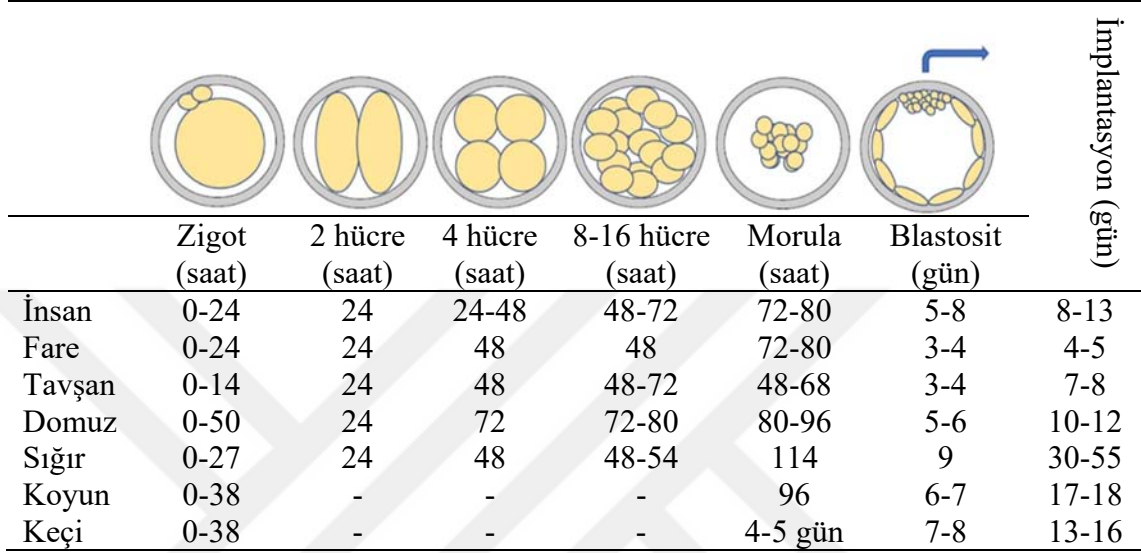


Şekil 2.6. Sığır preimplantasyon gelişimi sırasında meydana gelen önemli gelişimsel olayların dinamiği (Zhang ve Smith 2015).

Döllenmeden kısa bir süre sonra ve 8-16 hücreli aşamadan önce, embriyonik genom aktivasyonu meydana geldiğinde, erken embriyonik gelişim, bu dönemde transkripsiyonel susturma nedeniyle maternal olarak depolanan faktörlere dayanır.

Embriyonik genom kademeli olarak aktive edilirken maternal faktörler kademeli olarak bozulur (Zhang ve Smith 2015).

Eşeyli üremde, DNA transkripsiyonu spermde gerçekleşmez ve primer oositlerde ise oosit oluşturmak üzere mayotik olgunlaşmaya uğradıklarında durur (Zhang vd. 2003). Zigot genlerinin transkripsiyonu, DNA replikasyonunu takip eder, ancak gerçekleştiği zaman hayvanlar arasında büyük farklılıklar gösterir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Farklı memeli türlerinde bir zigottan implantasyona kadar döllenmeden sonraki gelişimin zamanlaması (Llobat 2021).

2.2.1. TE/ICM hücre soylarının farklılaşması

Zigot 2 hücreli yapı kazandıktan sonra seri mitoz bölünme geçirir. Zigotun çok hücreli bir organizma meydana getirmek üzere geçirdiği seri mitotik bölünmelere segmentasyon denir. Bölünme sonucu her oluşan hücrenin hacmi gittikçe küçülür. Küçülen bu hücrelere “blastomer” adı verilir. Üç-dört bölünmeden sonra zigot bir dut tanesi gibi bir şekil alır. Toplam ve eşit bölünme sonucunda meydana gelen küre şeklindeki hücre yığını safhasına morula denir.

Morula oluşumunun başlangıcında tüm hücreler birbirine benzemektedir. Bu safhada her bir hücre sınırı kolayca tanımlanabilir ve tüm hücreler totipotenttir (Chen vd. 2010). Sığır embriyosunda yaklaşık 16-32 hücreli aşamada başlayan sıkıştırma (kompaksiyon), morulanın dış hücreleri arasında sıkı bağlantıların oluşumunu sağlar. Böylece hücreler düzleşir ve bireysel blastomerler artık ayırt edilemez hale gelir (Calarco ve Brown 1969; Ducibella vd. 1977). Kompaksiyonun ardından dış hücreler polarize olur (Fleming ve Pickering 1985) ve embriyonun dış ve iç hücreleri farklı ortamlara maruz kalır. Hücre polarizasyon komplekslerinin aktivasyonunu takiben dış hücreler arasında geçirimsiz bir mühür oluşturan apikal alan üzerinde sıkı bağlantılar oluşmaya başlar. Aynı zamanda bu hücrelerde totipotensi kaybına yol açan moleküler değişiklikler başlar ve böylece dış hücreler farklılaşır ve iç hücreler pluripotent olarak kalır (Ducibella vd. 1975;

Levy vd. 1986; Nikas vd. 1996; Suwińska vd. 2008). Kompaksiyonun sonunda; blastomerler, yapışık bağlantılar (AJ: Adherens junctions), sıkı bağlantılar (TJ: Tight junctions), boşluk bağlantıları (GJ: Gap junctions) ve desmozomlar yoluyla bağlanır (Bell vd. 2008; Eckert ve Fleming 2008). Sonuç olarak, dış hücreler ovidükt kanalında bir mikro-ortama ve iç hücreler blastosöl sıvısına maruz kalır. Polaritedeki ve mikro-ortamlardaki farklılıklar, iç hücre kitlesi (ICM) ve trofektodermin (TE) oluşumuyla sonuçlanan ilk farklılaşma için önemlidir (Fleming 1987; Watson ve Barcroft 2001). İç hücreler pluripotent kalıp ICM'yi oluştururken, dış hücreler plasental doku öncüsü olan TE'ye dönüşür. Embriyonun blastosöl adı verilen sıvı dolu bir alan edindiği, TE ve ICM'nin kolaylıkla tanımlanabildiği blastosist oluşumu, gelişimin 7. gününde gerçekleşir (Betteridge ve Fléchon 1988). Yaklaşık 12-24 saat sonra ICM, epiblast (fetal dokuların öncüsü) ve hipoblastı (ekstraembriyonik dokuların öncüsü) oluşturmak için ikinci bir farklılaşma olayına girer (Arnold ve Robertson 2009; Kuijk vd. 2012; Morris ve Zernicka-Goetz 2012; Denicol vd. 2014). Preimplantasyon gelişimde görülen bu hücre soyu farklılaşması olaylarından ilki (TE/ICM) bu tez çalışmasında konu edinilmiştir. Bu nedenle bu süreçte etkili olan faktörler aşağıda detaylandırılmıştır.

2.2.2. TE/ICM farklılaşmasında etkili olan genler

Preimplantasyon gelişimde görülen TE ve ICM hücre soylarının farklılaşmasında rol oynayan sinyal yollarında yer alan bir dizi transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri, kemirgen olmayan memelilerde hücre farklılaşması olaylarında farklı zamansal ekspresyon profilleri ve rolleri sergilemektedir (Pérez-Gómez vd. 2021). CDX2, GATA3 veya TEAD4 genleri TE'ye özgü olup sığır (Wei vd. 2017; Negrón-Pérez vd. 2017; Gerri vd. 2020), domuz (Ramos-Ibeas vd. 2019a; Kong vd. 2020) ve insan (Gerri vd. 2020; Niakan ve Eggan 2013; Blakeley vd. 2015) blastosistlerinin TE'sinde de ifade olmaktadır. Ancak, bu genlerin ifade miktarı ve ifade zamanlamasında sığır, domuz gibi toynaklılar ve kemirgenler arasında dikkate değer farklılıklar gözlemlenmektedir.

CDX2 proteinin ekspresyonu farelerde blastosist aşamasından önce tüm hücrelerde görülürken domuz ve sığırlarda bazı dağınık hücrelerde sınırlı kalmaktadır (Strumpf vd. 2005; Berg vd. 2011; Bou vd. 2017). CDX2 ve EOMES gibi TE genlerinin yukarı regülasyonunun düzenleyicisi olan TEAD4'ün aşağı regülasyonunun sığırlarda blastosist oluşumunu bozmaması (Sakurai vd. 2017; Akizawa vd. 2018) nedeniyle toynaklı hayvanların TE farklılaşması için gerekli olmadığı söylenebilir. Ancak, farelerde Tead4 ablasyonunun blastosöl formasyonunu (TE genişlemesi dolayısıyla blastosist oluşumu) tamamen ortadan kaldırmaktadır (Nishioka vd. 2008; Yagi vd. 2007).

CDX2 kemirgen blastosistlerinin TE'sinde OCT4 ifadesini baskımlarken (Niwa vd. 2005) sığır OCT4 geninin promotör bölgesi farelerde OCT4 baskılanması için gerekli olan bölgeden (CR4'den) yoksun (Berg vd. 2011) olması nedeniyle sığır embriyolarında CDX2'nin aşağı regülasyonu OCT4 ifadesini etkilememektedir (Berg vd. 2011; Goissis ve Cibelli 2014b). Benzer şekilde hem CDX2 hem de OCT4 fare blastosistlerinde karşılıklı ters ifade modeli gösterirken (Strumpf vd. 2005) insanlarda, domuzlarda ve sığırlarda geç blastosist aşamasına kadar TE'de görülmektedir (Berg vd. 2011; Cauffman vd. 2005; Kirchhof vd. 2000). Son yıllarda yapılan gen susturulması (KO) çalışmaları ile

kemirgen, bazı toynaklılar ve insanlar arasında OCT4'ün farklı bir fonksiyonu vurgulanmıştır. OCT4-KO fare embriyoları hipoblast (ICM'de gerçekleşen ikinci farklılaşma sonrası oluşan hücre soyu) oluşumu bozulmasına rağmen blastosist oluşturabilmektedir. Ancak, OCT4-KO morulalarda OCT4 proteinin yokluğu hem sığır (Daigneault vd. 2018) hemde insanlarda (Fogarty vd. 2017; Stamatiadis vd. 2021) blastosist oluşturamazken, CDX2 ifadesini de azaltmaktadır.

2.2.2.1. CDX2 geni

CDX2 geni fare embriyolarının TE'sinde tespit edilen kaudal tipte bir homeobox transkripsiyon faktörüdür (Beck vd. 1995). Farede, 16-32 hücreli aşamadaki embriyonun dış hücreleri CDX2'yi eksprese ederken, iç hücreler eksprese etmez. Blastosist aşamasında CDX2 ifadesi TE ile sınırlıdır (Ralston ve Rossant 2005; Suwińska vd. 2008). Dış hücrelerin epitel olarak polarize olması ve daha sonra TE haline gelmesi, ayrıca iç hücrelerin apolar olması ve ICM'ye yol açması nedeniyle (Sasaki 2010) TE spesifikasyonunun 16 hücreli aşamada başladığı tahmin edilmiştir. İlginç bir şekilde, Ralston ve Rossant (2008), apikal hücre polarizasyonunun 8 hücreli aşamada önceki CDX2 ekspresyonunu sağlıyor gibi görüldüğünü gözlemlemiş ve buna dayanarak bu genin TE spesifikasyonunun ana düzenleyicisi olmadığını öne sürmüştür. Ayrıca, CDX2'den yoksun embriyolar hala TE'yi oluşturabilmekte ancak TE'nin epitel bütünlüğü, sıkı ve yapışan bağlantılardan oluşan proteinin yer değiştirmiş lokalizasyonu nedeniyle zayıflamaktadır (Strumpf vd. 2005). Meissner ve Jaenisch (2006) daha sonra CDX2 yıkımının TE oluşumunu engellemediğini, ancak farede implantasyonu olumsuz yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Ancak CDX2'nin sığırlarda preimplantasyon gelişim üzerindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle CDX2 geni bu tez çalışmasında konu edinilmiştir.

2.2.2.2. GATA3 ve SOX2 genleri

GATA3, faredeki TE hücre farklılaşmasıyla bağlantılı olan bir transkripsiyon faktörüdür (Home vd. 2009; Ralston vd. 2010). GATA3 aynı zamanda domuz, koyun ve sığır embriyolarında da güvenilir bir TE belirteçidir (Pérez-Gómez vd. 2021). Bu nedenle CDX2 geninin KO edilmesinin TE hücre sayısına etkisini belirlemek amacıyla Gata3 proteini immünohistokimyasal olarak boyanmıştır.

SOX2, 20 geni kapsayan SOX protein ailesine içerisinde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür (Wegner, 2010). Farelerde, SOX2 mRNA'sı önce morulanın bazı hücrelerinde ifade edilmektedir ve daha sonra blastosistlerin ICM'si ile sınırlandırılmaktadır. Ancak, maternal protein oositlerde ve preimplantasyon embriyo gelişimi boyunca blastosist aşamasına kadar saptanmaktadır (Avilion vd. 2003). Transkripsiyon faktörleri OCT4 ve SOX2, NANOG ile embriyonik kök hücrelerde (ESC'ler), fare ve insan blastosistlerinin ICM'sinde yüksek oranda ifade edilmektedir (Liu vd. 2008). Sığırlarda, SOX2'nin transkriptleri hem maternal hem de embriyonik genomlardan kaynaklanmaktadır ve fare embriyogenezine benzer şekilde, blastosist aşamasında SOX2 geninin aktif olduğu hücreler ICM ile sınırlıdır. Bu durum SOX2'nin sığır ICM'si için spesifik bir protein belirteci olabileceğini göstermektedir (Goissis ve

Cibelli, 2014a). Bu sebeple iç hücre kitlesi (ICM) sayısını belirlemek amacıyla SOX2 geninin ifadesi sonucu oluşan Sox2 proteinleri immünohistokimyasal boyamalar yardımıyla referans alınmıştır.

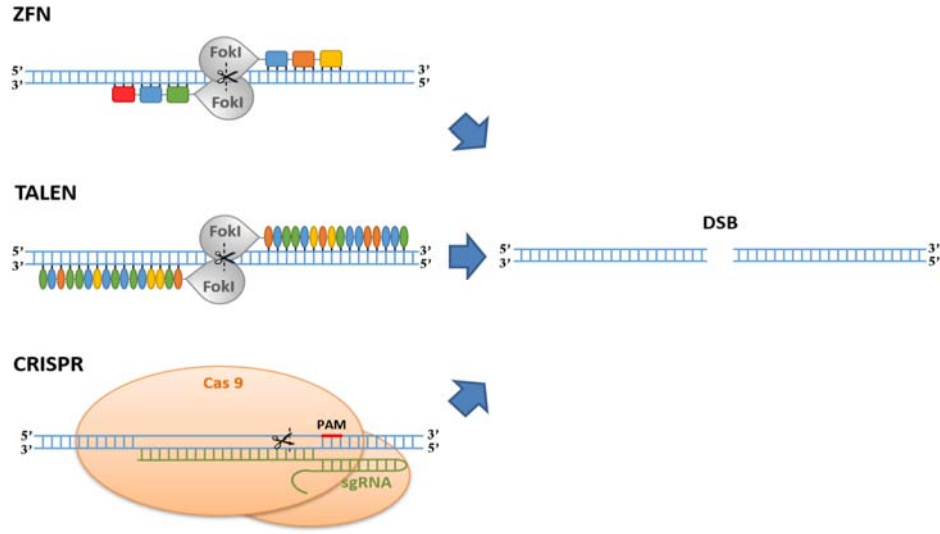
2.3. Gen Düzenleme

DNA baz dizilimine özgü endonükleazların keşfedilmesi programlanabilir gen düzenlenmesini mümkün kılarak genom modifikasyonu alanında devrim yaratmıştır. Bugüne kadar, genomu modifiye edilmiş memelilerin üretimi için üç tür programlanabilir gen düzenleme yöntemi başarıyla uygulanmıştır. Bunlar; çinko-parmak nükleazları (ZFN: Zinc Finger Nuclease) (Geurts vd. 2009; Whyte vd. 2011), transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlar (TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease) (Carlson vd. 2012; Tesson vd. 2011) ve düzenli aralıklılarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Shen vd. 2013; Wang vd. 2013) yöntemleridir.

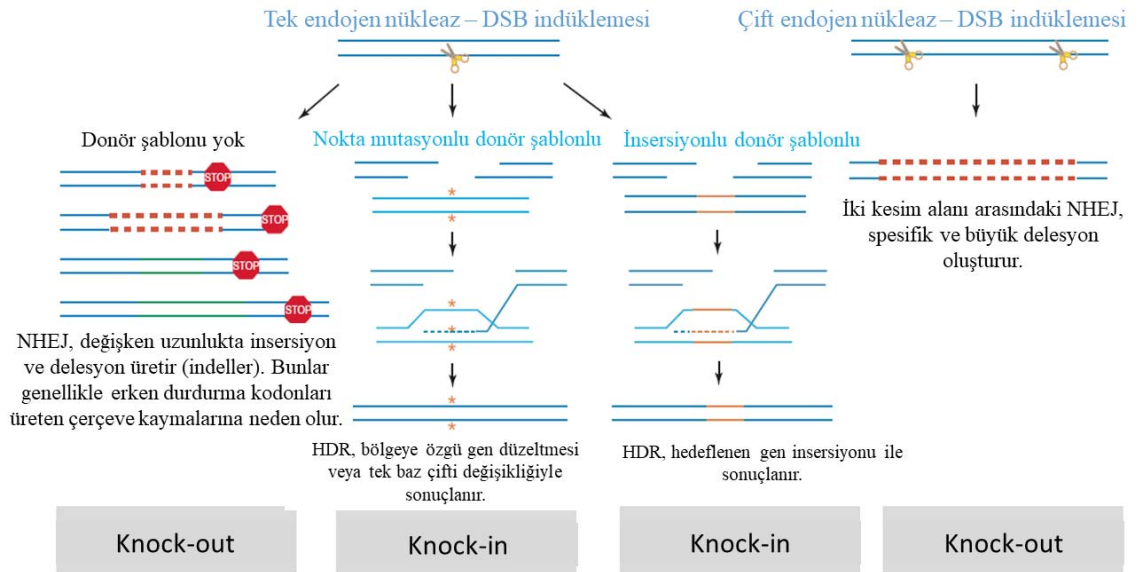
ZFN, belirli nükleotit üçlülerini tanıyan birkaç çinko parmak alanına birleştirilmiş bir FokI endonükleaz alanından oluşur. FokI endonükleaz alanı bir dimer olarak işlev gördüğünden, her iki tamamlayıcı zincirde birbirine yakın konumlandırılmış iki çinko-parmak alanı seti gereklidir. Benzer şekilde, TALEN, FokI ve birkaç protein bazlı hedef tanıma alanından (TAL efektör) oluşur. Bu durumda, tanımaya 33-35 amino asit TAL efektör aracılık eder, burada 12 ve 13 konumlarındaki amino asitler bir nükleotide özgüllük kazandırır (örneğin, 12 ve 13 konumlarında asparagin ve izolösin içeren bir alan adenini tanır). Öte yandan, CRISPR sistemi, hedef diziye RNA kılavuzluğundadır. *Streptococcus pyogenes* tip II CRISPR'den tasarlanmış sistemde, bir sgRNA'nın (tek rehber ribonükleik asit) 20 nükleotidi, Cas9'u (endonükleaz) bir Protospacer Bitişik Motif (PAM: Protospacer Adjacent Motif) dizisi (NGG) tarafından takip edilmesi gereken hedef bölgeye (protospacer) yönlendirir.

Programlanabilir genom düzenleme yöntemleri, araştırmacıların çok çeşitli organizmalardaki herhangi bir geni manipüle etmesine olanak tanımaktadır. Üç teknoloji arasındaki hedefleme yöntemlerindeki ve ilgili endonükleazların farklılıkları Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Moleküler mekanizmaları ise 'hedef dizide bir DNA çift sarmal kırılması (DSB) oluşturma' hedefini takip etmektedir.

Çift zincir kırığı oluşması homolog olmayan uç birleştirme onarımı (NHEJ: Non-Homologous End Joining) ve homolojiye yönelik onarım (HDR: Homology-Directed Repair) gibi DNA onarım mekanizmalarına yol açar. Hataya meyilli NHEJ, sonunda nükleotitlerin eklenmesine veya silinmesine (indellere) neden olurken, HDR aracılığıyla DSB'nin mükemmel bir onarımı veya hedeflenen bir ekzojen onarım şablonunun yerleştirilmesi elde edilebilir (Şekil 2.9) (Gaj vd. 2013).



Şekil 2.8. Endonükleaz aracılı programlanabilir gen düzenleme yöntemleri (Lamas Toranzo, 2021).



Şekil 2.9. DNA çift sarmal kırık onarım mekanizmaları (Maeder ve Gersbach 2016'dan değiştirilmiştir).

Bölgeye özgü nükleazların yüksek verimliliği, embriyolara doğrudan teslim edilerek tek adımlı KO'ların üretilmesine izin vermektedir. Ancak bu üç programlanabilir gen düzenleme yöntemi arasında bazı bakımdan avantaj ve dezavantajlar bulunmaktadır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Programlanabilir gen düzenleme yöntemlerinin karşılaştırılması (Petersen 2018).

	ZFN	TALEN	CRISPR
Hedef Bölge	Çinko-Parmak proteinler	Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör	CRISPR RNA veya tek zincirli kılavuz RNA
Nükleaz	FokI	FokI	Cas9/FokI
Biallelik nakavt elde edildi	Evet	Evet	Evet
Ortalama Mutasyon Oranı	++	+++	+++
Tanıma Bölgesinin Uzunluğu	18-36 bç	30-40 bç	20 bç
Hedef bölgede restriksiyon	G-zengin	T ile başlayıp, A ile sonlanan	Hedef bölgenin sonunda PAM
Vektör tasarılmasının karmaşıklığı	-	+	+++
Hedef dışı olaylar	Değişken	Düşük	Değişken, tanımlanabilir
Sitotoksosite	Değişken - Yüksek	Düşük	Düşük
Gerekli plazmit sayısı	2	2	1 (bir CRISPR/FokI yapısı olması durumunda, 2)
Maliyet	++++	++-	+--

Protein güdümlü ZFN ve TALEN'in aksine RNA güdümlü bir sistem olması nedeniyle CRISPR'in uygulanması daha kolay ve esnektir. Ayrıca, CRISPR/Cas9'un tasarımı daha kolaydır, daha yüksek mutajenez verimliliğine sahiptir ve ucuzdur (Seruggia ve Montoliu 2014). Ayrıca, birkaç genin eşzamanlı multipleks düzenlenmesini sağlar (Hsu vd. 2014). Bu gibi çeşitli avantajlarından dolayı bu tez çalışmasında da CRISPR kullanılması planlanmıştır. Bu teknolojiye ait detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.3.1. CRISPR/cas9

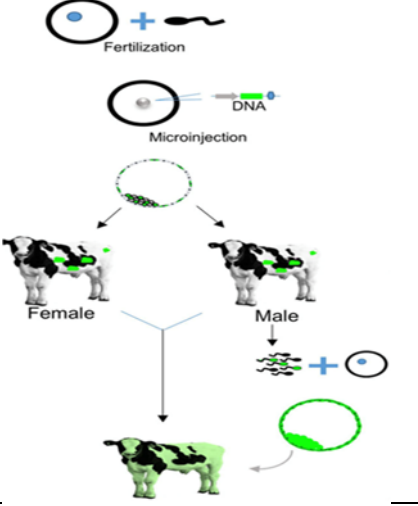
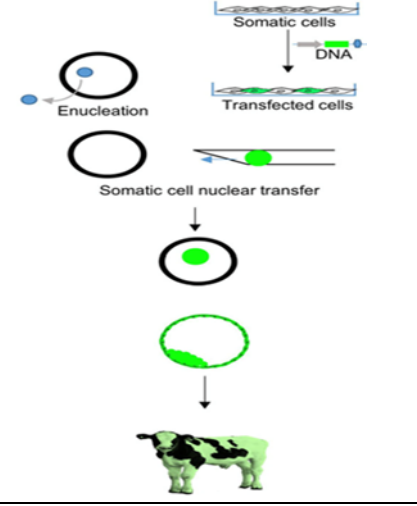
CRISPR/Cas9 sisteminin keşfi, çok yönlülüğü, yüksek verimliliği, kullanımının kolaylığı ve düşük maliyet gerektirmesi nedeniyle gen düzenlemede devrim yaratmış ve kapsamlı genom modifikasyonları ile hayvansal üretime olanak sağlamıştır (Hsu vd. 2014; Mir vd. 2022). CRISPR başlangıçta viral enfeksiyonlara (fajlara) karşı bakteri ve arkelerin adaptif bir bağışıklık sistemi olarak işlev gören bir lokus ailesi olarak keşfedilmiştir (Barrangou vd. 2007). Sistem, CRISPR lokusunda tekrar dizileri ile ayrılan aralayıcılar olarak önceki enfeksiyonlar sırasında önceden depolanmış kısa viral DNA fragmanlarını kullanmaktadır (Mojica vd. 2005). Bu aralayıcılar, yeniden enfeksiyon

meydana geldiğinde Watson-Crick baz homolojisiyle bir CRISPR ile ilişkili (Cas) efektör endonükleazını hedef yabancı DNA'ya (protospacer) yönlendiren CRISPR RNA'ya (crRNA) kopyalanır ve işlenir. Üç tip CRISPR sistemi olsa da bunlardan en iyi karakterize edileni ve yaygın olarak kullanılan Tip II CRISPR'dır. Bu sistemde; crRNA, olgunlaşmasına ve Cas9 endonükleaz ile birleşmesine aracılık eden işlem yapan bir CRISPR RNA'ya (tracrRNA) bağlanır (Deltcheva vd. 2011). Kompleks crRNA-tracrRNA-Cas9, crRNA'nın (aralayıcı) 20 nükleotidi tarafından baz eşleşmesi yoluyla hedef DNA'ya (protospacer) yönlendirilir ve bunu hemen bir Protospacer-Adjacent Motif (PAM) dizisi takip etmelidir. En yaygın olarak kullanılan sistem, *Streptococcus pyogenes*'den türetilir ve N'nin herhangi bir nükleotit olduğu bir PAM dizisi (NGG) gerektirir. Bu lokusta Cas9, yabancı DNA'yı devre dışı bırakarak PAM'ın üç baz çifti (bç) yukarısında bir DSB'yi indükler (Jinek vd. 2012).

Çalışma mekanizması öğrenildikten sonra, CRISPR *in vitro* uygulanabilecek şekilde (crRNA ve tracrRNA, tek kılavuzlu bir RNA'ya kaynaştırılmış: sgRNA) tasarlanmış (Jinek vd. 2012) ve memeli hücrelerinin genom baskısı uygulanmasında kullanılmıştır (Mali vd. 2013). CRISPR tarafından üretilen DSB, ökaryotik hücrenin endojen DSB onarım mekanizmaları tarafından bir mutasyona dönüşebilir. Bu onarım mekanizmalarından, NHEJ, bir DSB'yi sabitlemek için genellikle nükleotidleri ekleyen veya silen (indeller) hataya açık bir onarım yoludur (Moore ve Haber 1996; Wilson ve Lieber 1999).

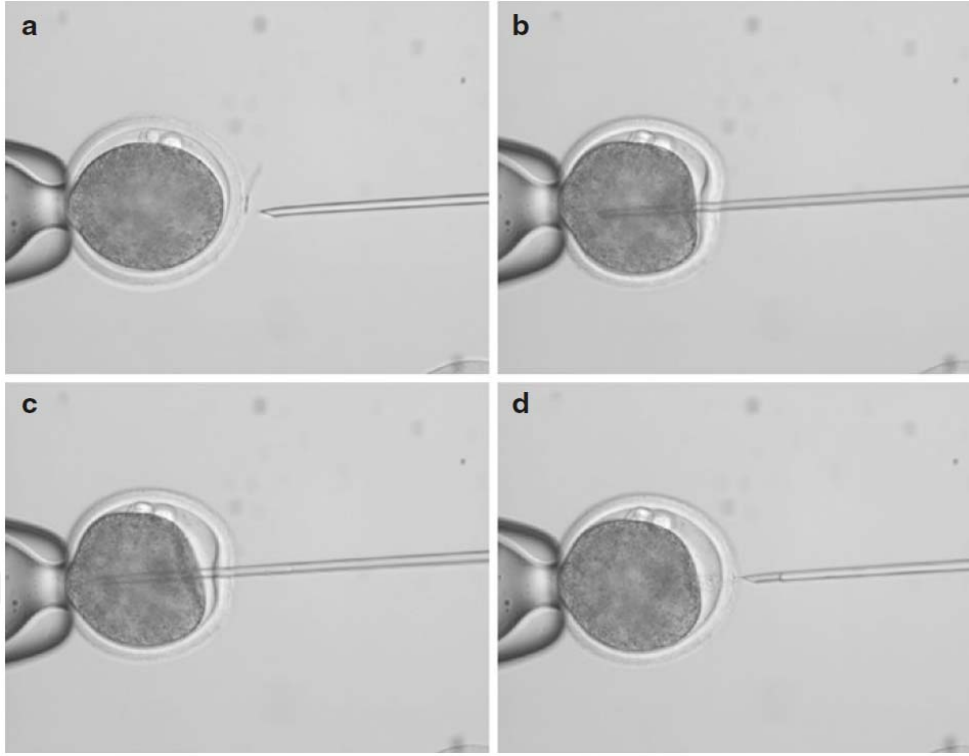
CRISPR/Cas9'u bir genom düzenleme aracı olarak kullanmak için, crRNA ve tracrRNA'nın füzyon ürünü (gRNA), Cas9 ile birlikte bir hücreye veya organizmaya verilmektedir. Küçük kılavuz RNA olan gRNA'nın (sgRNA) 5' ucundaki 20 özelleştirilebilir nükleotid, ardından Cas9'u Watson ve Crick baz eşleşmesi yoluyla belirli bir bölgeye yönlendirmektedir ve burada Cas9 bir DSB'yi indüklemektedir. sgRNA tasarımındaki tek sınırlama, memeli genomunda ortalama olarak her 8 bç'de bir meydana gelen, 3' ucunda bir NGG protospacer bitişik motifinin (PAM) zorunluluğudur (Sander ve Joung 2014; Seruggia ve Montolieu 2014).

CRISPR/Cas9 teknolojisi ile KO oluşturulmasında iki temel düzenleme yaklaşımı vardır. Bunlar; bir hayvan oluşturmak için kullanılan somatik hücre genomlarının düzenlenmesi sonrası somatik hücre nükleer transferi (SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer) veya tek hücreli embriyoların (mikroenjeksiyon) doğrudan düzenlenmesidir (Laible 2018). Bu iki yaklaşım arasındaki temel farklılıklar Şekil 2.10' da özetlenmiştir.

	2 yıl		2 yıl
Mikroenjeksiyon -Uzun işlem süresi *Mozaik yapı -Genome sitabiletesi *SCNT için göreceli yüksek gebelik *Sağlıklı transgenik yavrular		Somatik Hücre Nükleer Transferi (SCNT) -MI'na göre daha kısa işlem süresi *Mozaik yapı yok -Genome kararsızlığı *Düşük gebelik oranı *Yüksek oranda düşük veya ani ölüm	

Şekil 2.10. Sığır üretiminde mikroenjeksiyon yoluyla gen susturma ve somatik hücre nükleer transferi yöntemlerinin karşılaştırılması.

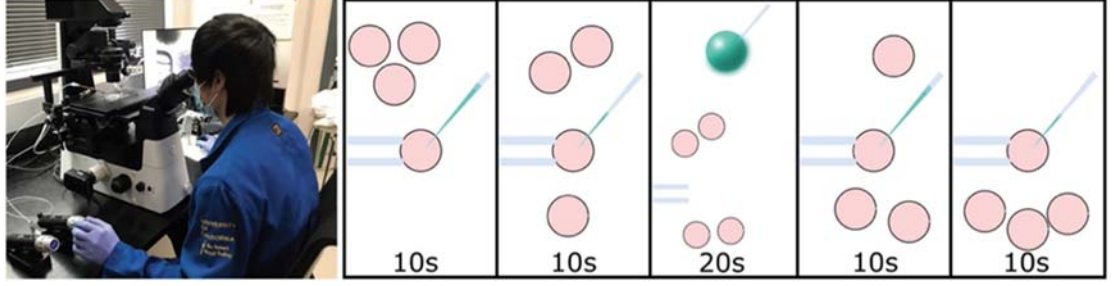
Zigotta yapılacak DNA düzenlemeleri sayesinde bir sonraki neslin farklılaşması mümkün hale gelmiştir. Klonlama yoluyla türetilen hayvanlar birbirinin kopyası olurken gen manipülasyonu yapılmış zigotlardan genetik olarak birbirinden farklı hayvanlar üretilmesi önemli bir avantajdır (Bishop ve Van Eenennaam 2020). Bugüne kadar, genom düzenleme bileşenlerini çiftlik hayvanı zigotlarına entegre etmenin standart yöntemi sitoplazmik mikroenjeksiyon olmuştur (Şekil 2.11). Bu yöntemde tecrübeli bir kişi tarafından genom düzenleme bileşenlerinin sırasıyla zigota enjekte edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu yöntem yüksek donanımlı özel laboratuvarlarda daha fazla iş gücü ve zaman gerektirir. Çok sayıda zigotun mikroenjekte edilmesi saatler alabilir ve bu, dölllenmeye göre mikroenjeksiyon zamanlamasında önemli değişikliklere neden olabilir.



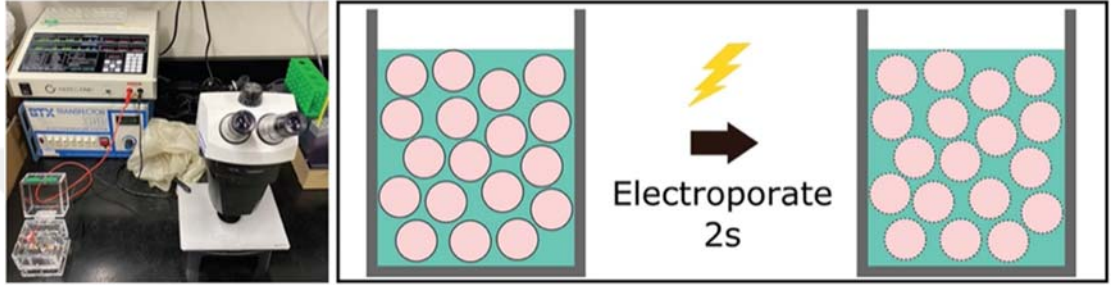
Şekil 2.11. Sığır zigotlarında mikroenjeksiyon uygulamasının aşamaları; **(a)** bir tutma pipeti ile zigotun hareketsizleştirilmesi, **(b)** enjeksiyon iğnesi ile zona pellusida ve alttaki plazma zarının penetrasyonu, **(c)** ilgili efektör molekülleri içeren küçük bir hacmin enjeksiyonu, ve **(d)** enjeksiyon tamamlandıktan sonra iğnenin geri çekilmesi (Laible, 2018).

Mikroenjeksiyona alternatif olarak elektroporasyon yöntemi kullanılarak DNA veya RNA'yı tek hücreli embriyolara aktarmak mümkündür (Grabarek vd. 2002). Elektroporasyon protokolü yalnızca bir stereo mikroskop, bir elektroporator ve bir elektroporasyon kuvveti gerektirir. Zigotlar, genom düzenleme reaktifleri içeren bir besiyerinde süspansiyon edilirken bir küvete veya bir slayt üzerine yerleştirilmektedir (Takemoto 2020). Bireysel embriyoların mikroenjeksiyonu ile karşılaştırıldığında elektroporasyon süreci daha basittir. Elektroporasyon yöntemi otomasyona uygun olduğundan dolayı onlarca embriyodan oluşan gruplar aynı anda düzenlenebilir (**Şekil 2.12**). Genom düzenleme reaktiflerinin teslim edilmesinin iş akışı, 35-100 zigotun herhangi bir yerde aynı anda elektroporasyona tabi tutulabilmesi nedeniyle mikroenjeksiyona göre önemli ölçüde hızlandırılmıştır (Modzelewski vd. 2018). Bunların yanı sıra sığırlarda, zona içermeyen zigotların elektroporasyonunun HDR'nin bir sonucu olarak kesin mutasyonların ortaya çıkmasına da olanak sağladığı bildirilmiştir (Wei vd. 2018). Bu tez çalışmasında sığır CDX2 geninin düzenlenmesi için mikroenjeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

a) Mikroenjeksiyon



b) Elektroporasyon



Şekil 2.12. Mikroenjeksiyon ve elektroporasyon yöntemlerinin grafiksel özeti. (Lin ve Van Eenennaam 2021’den düzenlenmiştir).

3. MATERYAL VE METOT

Dr. Pablo Bermejo-Alvarez tarafından yürütülen Avrupa Araştırma Konseyi (StG-757886-ELONGAN) ve İspanya Bilim ve İnovasyon Bakanlığı (PID2020-117501RB-I00) tarafından desteklenen projelerin bir bölümü bu tez çalışmasının konusu olmuştur. TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs programından sağlanan burs ile 12 ay süresince bu projelere dahil olunmuş ve tez çalışmasının tüm aşamaları başarıyla tamamlanmıştır. İspanya Bilim ve İnovasyon Bakanlığı, Ulusal Tarım ve Gıda Araştırma Enstitüsü (INIA) bünyesinde yer alan Hayvan Üreme Bölümü, Hayvan Genomik Mühendisliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında; materyalin toplanması, deneme için hazırlanması, gRNA+Cas9 reaktiflerinin hazırlanması, CRISPR teknolojisinin uygulanması, mikroyenjeksiyon, *in vitro* embriyo üretimi, immünohistokimyasal boyama ve gerekli rutin laboratuvar işlemleri gerçekleştirilmiştir. Gen düzenlenmiş embriyoların genotiplenmesi için gerekli sekanslama işlemleri hizmet alımı (Stabvida, Madrid) ile yapılmıştır (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer).

3.1. Materyal

Gerçekleştirilen tez çalışmasının materyalini östrus döngüsünün çeşitli aşamalarındaki sığırların ovaryumlarından toplanan oositler oluşturmıştır. Araştırmada kullanılan sığır ovaryumları Madrid'de bulunan yerel mezbahalardan sağlanmıştır. Sığırların kesiminden hemen sonra iç organların temizlenmesi esnasında iç organlar henüz sıcaklığını kaybetmeden steril aletler yardımıyla ovaryumlar alınmış ve 37°C sıcaklık muhafazalı sodyum klorür solüsyonuna daldırılmıştır. Bu şekilde toplanan ovaryumlar steril zincir yoluyla laboratuvara taşınmıştır.

Ovaryumlardan aspire edilen oositlerden kontrol ve deney grubu olarak 2 deneme grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubunda 276 adet, deney grubunda ise 595 adet oosit ile çalışılmıştır. Deneme gruplarındaki oositlerin *in vitro* fertilizasyonunda ticari olarak elde edilen bir babadan dondurulup-çözdürülmüş spermalar kullanılmıştır.

3.1.1. Laboratuvar gereçleri

Çalışmada kullanılan araç gereçler Çizelge 3.1'de, kimyasallar Çizelge 3.2'de, ticari kitler Çizelge 3.3'te, antikorlar Çizelge 3.4'te detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, marka ve özellikleri ve kullanım amaçları.

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Termos	Decathlon	Mezbahadan toplanan ovaryumların laboratuvara taşınması.
Su banyosu Behr	Daihan Brand	Aspirasyon sürecinde ovaryumların 37 °C muhafazası.

(Devamı arkada)

Çizelge 3.1'in devamı

Enjektör Şırınga	Kruuse (12 ml) Braun (18 G)	Ovaryumlardan oositlerin aspirasyonu.
Otomatik pipet Disponible pipetler	Brand SPL Life Sciences	Oositin peletinin üzerinden folikül sıvısının atılması.
Mikroskop	ZEISS (Stemi 305)	
Kabin	Labogene	
Petriler	Sarstedt	Kaliteli KOK seçilmesi.
Isıtıcı tabla	Minitube	
Kuyulu petri	Nunc	Oositlerin maturasyonu.
Falkon	BD	
Vorteks	Biosan	Mature oositlerin toplanması, kumulus kompleksinin uzaklaştırılması.
İnkübatör	HERACELL	Oositlerin maturasyonu ve fertilizasyonu.
Mikromanipülatör	Eppendorf (TransferMan 4r)	Oositlere CRISPR reaktifinin enjeksiyonu.
Azot tankı	Henan Tianchi	Dondurulmuş olarak temin edilen spermin muhafazası.
Cam şişe	Wheaton	Dondurulmuş sperm payetinin daldırılarak çözündürülmesi.
Santrifüj	Alresa	Sperm seperasyonu.
Thoma Lamı	Assistent	
Mikroskop	BOECO	Sperm konsantrasyonun belirlenmesi.
İnkübatör	Astec	Muhtemel zigotların kültürü.
Buzdolabı	Svan	Çözeltilerin muhafazası.
Apotome	ZEISS	
Pap-pen	Kisker	
Slide	Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön	Embriyoların morfolojik analizi.
Ependorf tüp	Brand, Wertheim	Embriyoların dondurulması.
Pipetler	Brand, Wertheim	
PCR cihazları	LongGene BIOER	
Elektroforez tankı	Ecogen	Embriyolardan DNA izolasyonu, hedef bölgenin amplifikasyonu ve jel de kontrolü.
Güç kaynağı	Consort	
Görüntüleme	Vilber Lourmat	
Çok kanallı pipetler	Brand, Wertheim	
Magnet safe plaka	İn vitrogen	Genotiplleme için kütüphane hazırlanması.
Kuyulu plaka	Nunc	
Nanodrop	Thermo	Kütüphane örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar, marka/özellikleri ve kullanım amaçları.

Kimyasallar	Marka/Özellikleri	Kullanım Amacı
NACI	Merck 6404	Ovaryumların taşınması
Euroflush	IMV Technologies	Yıkamalar
TCM199	Gibco 12340030	IVM
Gentamisin	Sigma G1272	
EGF	Sigma E 4127	
FCS	Sigma F 2442	IVM, IVC
Heparin	Calbiochem 37505	IVF
BW	Nidacon	
Bovipure	Nidacon	
Bovidilute	Nidacon	
Nidoil	Nidacon	IVC
PBS	Pan Biotech	Yıkamalar
PFA	Sigma, Steinheim	IHC
BSA	Sigma A 9647	
Glisin	Sigma, Steinheim	
Triton	Sigma, Steinheim	
Tween 20	Sigma, Steinheim	
Tris	Sigma, Steinheim	Kütüphane hazırlanması
ETOH	Merck	
Borik Asit	Sigma, Steinheim	Jel elektroforezi
EDTA	Roth, Karlsruhe	
Agaroz	BIOTOOLS	

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kitler, marka/özellikleri ve kullanım amaçları.

KİT	Marka	Kullanım amacı
Guide it- <i>in vitro</i> transcription	Takara	CRISPR reaktiflerin hazırlanması
mMESSAGE mMACHINE T7	Life Technologies	
ULTRA kiti	Addgene 42234	
Plasmid pMJ920	NEB	
Antartik Fosfotaz	Life Technologies	
MEGAClear	Thermo, Life Technologies	DNA ekstraksiyonu
Arcturus Picopure	Beckman Coulter	Genotipleme (Kütüphane hazırlama)
AMPPure XP Beads	Illumina	
Nextera XT		

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer antikorlar, marka/özellikleri ve kullanım amaçları

	Antikorlar	Taşıyıcı Tür	Marka	Hedef Bölge
Primer	CDX2	Fare	Biogenex MU392A-UC	Trofektoderm
	GATA3	Tavşan	Abcam ab199428	Trofektoderm
	SOX2	Rat	İnvitrogen 14-9811	İç Hücre Kitlesi
Sekonder	647	Eşek	İnvitrogen	Fare
	488	Eşek	İnvitrogen	Tavşan
	594	Eşek	İn vitrogen	Rat

*647: beyaz; 488: yeşil, 594: kırmızı renktedir.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve medyumlar

3.1.2.1. NaCl solüsyonu

Ovaryumların mezbahadan laboratuvara taşınması esnasında kullanılan tuz solüsyonu 9 gram NaCl 1000 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Bu karışıma 1 ml (%0,1) gentamisin eklenmiştir.

3.1.2.2. Maturasyon medyumu

Ovaryumlardan toplanan oositlerin *in vitro* koşullarda olgunlaştırılması için kullanılan medyumlar aşağıda açıklanmıştır.

EGF (Epidermal büyüme faktörü): 15 ml M199 (Sigma M4530) içerisine %0,1-1,0 (0,015-0,15 gr) BSA (Bovine serum albümin) eklenmiştir. Bu karışım 0,22 µm çaplı filtre kullanarak sterilize edilmiştir. Steril karışımdan 10 ml kullanılarak şişe içerisindeki EGF (0,1 mg) (Sigma E 4127) çözündürülmüştür. Çözelti 110 µl hacimlerde tüplere paylaştırılarak -20°C’de saklanmıştır.

FCS (Fetal buzağı serumu): 100 ml hacimdeki FCS (Sigma F 2442) şişesi çözündürülmüş ve 30 dk boyunca 56°C’de ısıtılma tabi tutulup, 30°C’ye soğutulduktan sonra 100, 500 ve 1000 µl’lik tüplere ayrılarak kullanıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

TCM199 (Doku Kültür Medyumu): 100 ml M199 (Sigma M4530) üzerine 0,5 ml gentamisin (Sigma G1272) eklenmiştir. +4°C muhafaza edilmekte olup pH değişimine bağlı olarak oluşan renk değişimine göre kullanım süresi değişebilmekle birlikte yaklaşık 2 haftadır.

Yıkama solüsyonu: Tüp 1: 9,9 ml TCM199 üzerine 100 µl EGF eklenir.

Maturasyon solüsyonu: Tüp 2: 8 ml TCM199 üzerine 1 ml FCS ve 1 ml yıkama solüsyonundan (Tüp 1) eklenerek hazırlanır.

3.1.2.3. Fertilizasyon medyum

Tyrodé's medyum: Çizelge 3.5'te ayrıntıları verilen kimyasallar iyice çözündürülmüş (Sigma) ve son hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin ozmolaritesi 230 osm civarı olmalıdır. Bu çözelti fertilizasyon medyum için gerekli olan diğer çözeltilerin (Fert, STL ve STL-BSA) hazırlanmasında temel çözeltilerdir.

Çizelge 3.5. Tyrodé's medyum çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Kaynak	Konsantrasyon (mM)	Miktar (mg/500ml)
NaCl	Merck 6404	100,0	3333
KCl	Merck 4936	3,1	120
NaH ₂ PO ₄	Merck 6346	0,3	20
CaCl	Merck 2382	2,1	150
MgCl ₂	Merck 5833	0,4	50
Phenol Kırmızısı	Merck 7241		5

STL ve STL-BSA (yıkama medyum): Çizelge 3.6'da detayları verilen 4 ayrı beher hazırlanır.

Çizelge 3.6. Yıkama medyum (STL ve STL-BSA) bileşenleri.

Beher No	Kimyasal	Kaynak	Miktar (mg)
1	Bikarbonat	Sigma S 5761	650
	Pürivat	Sigma P 3662	34
2	BSA *	Sigma A 6003	600
3	Hepes	Sigma H 3375	480
4	BSA	Sigma A 9647	840

* yağ asiti içermeyen kullanılmalıdır.

300 ml Tyrodé's medyumdan alınarak üzerine Çizelge 3.7'de verilen çözeltiler eklenir. Daha sonra bu karışım 100 ml ve 200 ml olarak 2 tüpe ayrılır. 100 ml üzerine Çizelge 3.7'de içeriği gösterilen 'Beher 2' karışımı eklenerek fertilizasyon medyum elde edilir. 200 ml üzerine ise 'Beher 3' karışımı eklenerek, 140 ml ve 60 ml olarak ikiye bölünür. STL medyum için 140 ml üzerine 'Beher 4' karışımı eklenir, BSA içermeyen STL medyum için ise 60 ml karışım kullanılır.

Çizelge 3.7. Tyrode's medyum üzerine eklenen çözeltiler.

Bileşen	Kaynak	ml
'Beher 1' içeriği		
Laktat şurubu	Sigma L 4263	0,92
Gentamisin	Sigma G 1272	1,48

Fertilizasyon medyumunu filtre edildikten sonra 10 ml olacak şekilde bölünerek 2 haftaya kadar +4°C muhafaza edilerek kullanılabilir.

Heparin: Son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde Sigma su ile hazırlanır. Filtre edilerek 110 µl olarak tüplere konulur, -20°C de muhafaza edilir.

Fertilizasyon medyumunu (10 ml) içerisine 100 µl heparin eklenerek *in vitro* fertilizasyonda kullanılmalıdır.

3.1.2.4. Kültür medyumunu

SOF (Sentetik Ovidükt Sıvısı): Embriyoların *in vitro* olarak üretilmesinde SOF kültür medyumunu kullanılmıştır. Bu kültür medyumunun hazırlanmasında öncelikle kullanılan bazı bileşenlerinin stok çözeltilerin hazırlanması gerekmektedir.

STOK A: 10x konstrasyonda hazırlanmıştır. +4°C'de 1 ay süre ile saklanabilmektedir. Bu stok çözeltisin bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. STOK A çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal	Kaynak	gr/100ml
NaCl	Merck 6404	6,290
KCl	Merck 4936	0,534
KH ₂ PO ₄	Merck 4873	0,162
MgSO ₄	Merck 5886	0,182
Na Laktat*	Sigma L-4263	0,600 ml
Sigma Su		99,4 ml

*En son eklenmelidir.

STOK B: 10x konstrasyonda hazırlanmış bikarbonat-fenol kırmızısı çözeltisidir. +4°C'de 1 ay süre ile saklanabilmektedir. Bu stok çözeltisin bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. STOK B çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal	Kaynak	gr/100ml
NaHCO ₃	Sigma S5761	2,100
Fenol Kırmızısı	Merck 7241	0,010

STOK C: 10x konstrasyonda hazırlanmış pirüvat çözeltisidir. +4°C’de 1 ay süre ile saklanabilmektedir. Bu stok çözeltisin bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları Çizelge 3.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. STOK C çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal	Kaynak	gr/10ml
Na-pürivat	Sigma P3662	0,0800
Sigma Su	Sigma W1503	10

STOK D: 100x konstrasyonda hazırlanmış CaCl₂ (Kalsiyum Klorür) çözeltisidir. +4°C’de 1 ay süre ile saklanabilmektedir. Bu stok çözeltisin bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları Çizelge 3.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. STOK D çözeltisinin bileşenleri

Kimyasal	Kaynak	gr/50ml
CaCl ₂	Merck 2382	1,3100
Sigma Su	Sigma W1503	50

Gerekli olan tüm stok çözeltiler hazırlandıktan sonra 0,22 µm çapındaki filtreler kullanılarak strelize edilmiştir. Daha sonra bu stoklar çözeltilerde kullanılarak SOF kültür medyumunu hazırlanmıştır. Bu medyumun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.12’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. SOF kültür medyumunu bileşenleri

Bileşen	Kaynak	Miktar (gr/100ml)
Sigma Su	Sigma W1503	78 ml
Tri-sodyum sitrat	Merck 6448	0,01
Myo-inositol	Sigma I7508	0,05
SOF-Stok A (ml)		10,00
SOF-Stok B (ml)		10,00
SOF-Stok C (ml)		1,00

(Devamı arkada)

Çizelge 3.12'nin devamı

SOF-Stok D (ml)		1,00
BME (ml)	Sigma B6766	3,00
MEM (ml)	Sigma M7145	1,00
L-glutamin (µl)	Gibco 25030-024	100,00
Gentomisin (µl)	Sigma G1272	500,00

Son olarak hazırlanan SOF-kültür medyumunu filtre edilerek 10 ml miktarda bölünmüştür. Bunlar +4°C'de 2 haftaya kadar muhafaza edilebilmektedir.

3.1.2.5. İmmunohistokimyasal boyama için kullanılan çözeltiler

PBS (Fosfat tampon solüsyonu): Hazır çözelti halindeki PBS'in pH:2 olarak ayarlanır.

PFA (Paraformaldehit): Embrioların fiksasyonu için kullanılmak üzere %4'lük hazırlanır, -20°C'de muhafaza edilir. Rutin kullanım sırasında +4°C'de en fazla 2 hafta süre ile saklanabilir.

PBS -%1 BSA: 1 gram BSA tartılarak, 100 ml PBS (Ca ve Mg içermeyen) içerisinde çözündürülür. Daha sonra 20 µm çaplı filtre kullanarak filtrelendir. 50ml'lik falkonlar içerisinde +4°C'de muhafaza edilir.

Glisin: Ana stok 1,5 M konsantrasyonda hazırlanır. Final konsantrasyonu 125 mM olacak şekilde 1:12 oranında dilüe edilerek kullanılır. Her kullanımda taze hazırlanmalıdır.

Permeabilizasyon çözeltisi: PBS-%1 BSA içerisine %1 triton eklenerek hazırlanır. Kullanmadan önce taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

Bloklama çözeltisi: PBS-%1BSA içerisine %10 FCS ve %0,2 Tween20 eklenir. Bu karışım +4°C'de muhafaz edilirken, en fazla 1 hafta kullanılabilir.

Primer Antikorlar Karışımı: Bloklama çözeltisine dilüsyon oranı 1:300 olacak şekilde her bir primer antikordan eklenir. Bu karışım en fazla 1 ay olmak suretiyle +4°C'de muhafaza edilerek birçok kez kullanılabilir.

Sekonder Antikorların Karışımı: Bloklama çözeltisi içerisine dilüsyon oranı 1:100 olacak şekilde her bir antikordan eklenir. Ayrıca çekirdeklerin hepsinin boyanması için 0,5ng konsantrasyonda olacak şekilde DAPI ilave edilir.

Etanol: Distile su üzerine son hacmi %80 olacak şekilde saf etanol eklenir. Kullanımdan önce taze olarak hazırlanmalıdır.

3.1.2.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism (GraphPad yazılımı, San Diego, CA, ABD) yazılım paketi kullanılmıştır. Kontrol ve deneme grupları arasında embriyonun gelişimsel (bölünme ve blastosist oranları) olarak karşılaştırılması için bağımsız gruplar t-testi kullanılmıştır. Elde edilen farklı genotipler (Wild type CDX2, non-knock out ve knock-out) arasında toplam hücre sayısı (DAPI+), ICM (SOX2+) sayısı ve TE (GATA3+) hücre sayılarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım testi Kolmogorov-Smirnov ile yapılmıştır. Normal dağılımın görülmediği durumlarda parametrik olmayan tek yönlü ANOVA (Kruskal-Wallis testi) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Gen düzenleme için CRISPR bileşenlerinin hazırlanması

3.2.1.1. CDX2 hedefli gRNA tasarımı

Sığır (*Bos taurus*) genomunda 12. kromozom üzerinde bulunan 5722 baz uzunluğundaki CDX2 genine (NCBI gen ID:618679) özgü ve hedefli gRNA tasarımı için CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) yazılımı kullanılmıştır. Tez çalışmasında CRISPR temelli CDX2 geninin susturulması amaçlandığı için 3 ekzon bulunduran gen üzerinde ilk ekzona bağlanarak o bölgede kırık oluşturacak şekilde gRNA'lar tasarlanmıştır. Bu amaçla, CRISPOR yazılımına gen dizisi fasta formatlı olarak girilmiştir. Daha sonra yazılım tarafından önerilen gRNA dizileri arasından verimlilik, hedef dışı etki, muhtemel mutasyon oranları incelenerek en etkili olacağı düşünülen 3 farklı gRNA belirlenmiştir.

CDX2 geninin 1. ekzon bölgesini içeren dizi NCBI'dan fasta formatında alınmış, tasarlanan gRNA'lar ve her bir rehber dizinin PAM bölgesi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

>XM_027557522.1 PREDICTED: Bos indicus x Bos taurus caudal type homeobox 2 (CDX2), transcript variant X2, mRNA

5' GACCGCCTCAGAGGCAGAAGCGCCGCGAGGAGCCGGCGGAGCTTCGCGGGCCGGAGCGCAGCCACCCGCCGTT
CCGGCGCCCCCTCGCCCCCTTCGCCAGCGCGCGCCCCCGGCAACCTCCAGCGTCCGTCCCTGGGCAGCATGGT
GAGGTTTCGCCGTGCGGCCCTCGCCA **CCATGTACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGGACGTGAGCATGTATCCCAGC**
TCCGTGCGCCACTC **CGG** **CAGCCTCAACCTGGCCCCGAGAACTTCGTACGCCCCCGCAGTACCCGGACTACGGC**
GGATACCATGTGGCGGCCGCGGCCGCCGCCGCAACCTGGACAGCGCGCAGTCCCCGGGGCCGTCTTGGCCT
GCCGCTACGGCGCCCCGCTCCGCGAGGACTGGAACGGCTACACGCCGGGGGGCGCGGCCGCCGCCAACGCC
GTAGCGCACGGCCTCAACGGGGGCTCCCCGGCCGCCATGGGCTACAGCGGGCCAGCCGATTACCACCCGCAC
CATCACCTCACCACCATCCGCACCAACCCGGCCGCCGCCCTCCTGCGCCTCCGGCTTGCTGCAGACGCTCAAC
CCCCGCCCCCGGGCCGGTCCGCCACCGCCGCCGCCGAGCAGCTGTGCCCCGGCGGCCAGCGGCCGAACCTGTGC
GAGTGGATGCGGAAGCCCGCGCAGCCGGCGCTGGGCAGCCAAGTGAACAGGACGAAAGACAAATACCGGGT
GTGTACACGGACCACAGCGTCTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCACTACAGTCGCTATATCACCATCCGGAGGAAA
GCCGAACCTGGCCGCCACGCTGGGGCTCTCAGAGAGGTTAAAATTTGGTTTCAGAACCAGCAGCAAAGGAAAGGA
AAATCAACAAGAAGAAGTTGCAACAGCAGCAGCAACAGCCGCCCCACCTTCTGGGCCACAGCCTCCCCAGCCAC
AGCCAGGTCCGCTGAGAAGCGTCCCAGAGCCCCTGAGCCCCGTGTCTCCCTGCAAGGCTCAGTGCCTGGGGTTC
TGGGGCCAGCTGGG -3'

CD1: **CCA** **TGTACGTGAGCTACCTCCTG**
CD2: **CGTGAGCTACCTCCTGGACA** **AGG**
CD3: **CCCAGCTCCGTGCGCCACTC** **CGG**

Şekil 3.1. CDX2 geni 1. ekzon bölgesi üzerinden hedef bölgeler için tasarlanmış farklı gRNA'lar. Sarı renk ekzon bölgesini, mavi renk gRNA baz dizisini, yeşil renk PAM bölgelerini göstermektedir.

3.2.1.2. CRISPR reaktiflerinin (gRNA ve Cas9) hazırlanması

Sığır CDX2 geni için tasarlanmış olan sgRNA (single guide RNA) Guide-it sgRNA *in vitro* Transkripsiyon Kiti® (Takara) kullanılarak sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Kaplanmış poliadenillenmiş Cas9 mRNA, şablon olarak BbsI ile doğrusallaştırılmış ve Antarktika fosfataz (NEB) ile muamele edilmiştir. Daha sonra plazmit pMJ920 (Addgene 42234) kullanılarak *in vitro* transkripsiyon (mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA kit®, Life Technologies) ile üretilmiştir. Elde edilen Cas9'u kodlayan mRNA, MEGAClear kiti (Life Technologies) kullanılarak saflaştırılmıştır. Cas9 mRNA kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

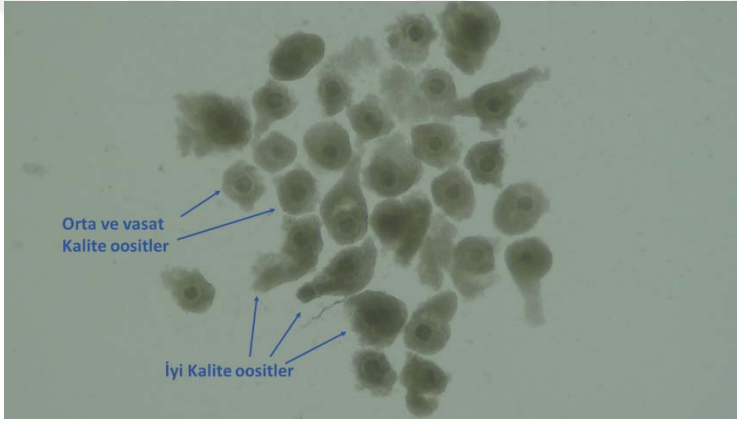
3.2.2. CDX2 geni düzenlenmiş embriyoların *in vitro* üretimi

3.2.2.1. Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu

Sığır yumurtalıkları yerel mezbahalardan toplanmış ve steril zincirde 3 saat içinde laboratuvara taşınmıştır. Kumulus-oosit kompleksleri (KOK) 2-8 mm çapındaki foliküllerden 18 G iğneli şırınga ile aspire edilmiştir (Şekil 3.2). Daha sonra steril kabin içerisinde invert mikroskop kullanarak geleneksel morfolojik kriterlere göre (Hawk ve Wall 1994) kaliteli olanlar seçilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Sığır oositlerinin ovaryumlardan folikül aspirasyon yöntemi ile elde edilmesi.



Şekil 3.3. Mikroskop altında kaliteli olduğu için seçilen kumulus-oosit kompleksleri (4x büyütme).

Sağlıklı oositler %5 CO₂, maksimum nem içeren 38,5°C'de %10 fetal buzağı serumu (FCS) ve 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) ile desteklenmiş 500 µl TCM-199 medyumunda içinde 24 saat boyunca inkübe edilerek *in vitro* maturasyonu gerçekleştirilmiştir.

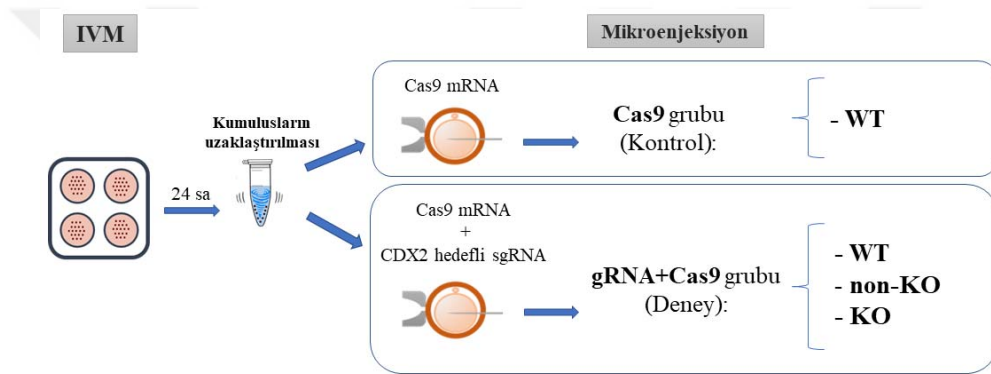
3.2.2.2. Mikroenjeksiyon

Gen düzenlenmiş embriyolarda ortaya çıkabilecek mozaikliği en aza indirdiği bilinen protokole (Lamas-Toranzo vd. 2019) göre mature (MII aşamasındaki olgun) oositlere fertilizasyon öncesi enjeksiyon yapılmıştır. Bunun için ilk olarak mature oositler 15 ml'lik falkon tüpte 1 ml euroflush içerisinde 3 dk vorteksenerek kumulusların oositlerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra oositlere aşağıda detayları verilmiş olan 2 farklı grup oluşturularak mikroenjeksiyon yapılmıştır.

1. Deney Grubu (gRNA+Cas9): CDX2 geninin susturulması (KO) için oositler sırasıyla 100 ng/μl sgRNA, 300 ng/μl Cas9 kodlayan mRNA içerecek şekilde hazırlanan solüsyon ile enjekte edilmiştir. Bu grup WT (wilt type), düzenlenmiş-KO olmayan (NKO: non-knock-out) ve susturulmuş (KO) embriyolarını içermektedir. Yapılan 8 bağımsız tekrarda toplam 595 oosite enjeksiyon yapılmıştır.

2. Kontrol Grubu (Cas9): Deney grubu ile aynı tekrarda elde edilen embriyoların gelişimlerinin karşılaştırılabilmesi için sadece 300 ng/μl Cas9'u kodlayan mRNA ile enjekte edilmiştir. Bu sadece WT embriyolarını içeren bir mikroenjeksiyon kontrol grubudur. Yapılan 8 bağımsız tekrarda toplam 276 oosite enjeksiyon yapılmıştır.

Tüm mikroenjeksiyon işlemleri bir FemptoJet 4i ve TransferMan 4r mikromanipülasyon ayarına bağlı bir Leica Dmi8 ters mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir. Bir filament iğne kullanılarak ooplazmaya 3-5 μl mikroenjeksiyon solüsyonu verilmiştir. Mikroenjeksiyon süreci Şekil 3.4'te şematize edilmiştir.



Şekil 3.4. Kontrol ve deney grubunda mikroenjeksiyon süreci

3.2.2.3. *In vitro* fertilizasyon

Maturasyonu sağlanan oositlerin mikroenjeksiyon sonrası *in vitro* fertilizasyonunda tek bir babadan dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoa kullanılmıştır. İlk olarak, çözdürülen spermatozoa içerisinde sağlıklı olanların seçiminde %80/%40 Bovipure gradient (Nidacon) yöntemi kullanılmıştır. Bunun için IVF'dan yaklaşık 3 saat önce gerekli hazırlıklar yapılmıştır. Öncelikle 15 ml'lik falkon tüpler içerisinde 3 farklı solüsyon hazırlanmıştır. Birinci solüsyon; 800 μl bovipure, 200 μl bovidilute (%80) içerirken ikinci solüsyon 400 μl bovipure, 600 μl bovidilute (%40) içermektedir. Son solüsyon ise yıkama amacıyla kullanılacak olan 2 ml boviwash falkon tüp içerisinde hazırlanmış ve yaklaşık 3 saat 38,5°C'ye ısınması için inkübatöre yerleştirilmiştir. Aynı zamanda 15 ml'lik falkon tüp içerisinde 10 ml TALP ortamına (BSA takviyeli TALP-Tyrod'un Albumin Laktat Medyumu) spermlerin kapasitasyonunu sağlaması için 100 μl heparin eklenmiş (bu karışım: fertilizasyon medyumu) ve ekilibasyon için inkübatöre gaz geçişine izin verilecek şekilde kapağı yarı açık olarak konulmuştur.

IVF saati geldiğinde sperma seçimi üreticinin protokolüne göre kısaca şu şekilde yapılmıştır; yoğun konsantrasyona sahip çözelti (%80) altta, düşük konsantrasyona sahip çözelti (%40) üstte olacak şekilde gradient tüp (%80/%40) hazırlanmıştır. Tek bir babadan dondurulmuş 1 payet sperma 38,5°C sahip su içerisinde yaklaşık 1 dk tutularak çözündürülmüş ve gradient tüp içerisine boşaltılmıştır. 10 dk 1000 rpm de santrifüj edilerek sağlıklı spermaların dibe çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant alındıktan sonra sperma peleti yıkama solüsyonu ile resüspanse edilerek 5 dk 1000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj devam ederken, çözündürülen sperma sayısını belirlemek için 95 µl distile su ve thoma lamı hazırlanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde alınmış, peletin falkon tüpe nazikçe vurularak resüspansiyonu sağlanmıştır. Resüspanse spermden 5 µl alınarak 95 µl distile su ile karıştırılmış ve bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamı üzerinde sperma sayısı belirlenmiştir. Nihai konsantrasyonu 10⁶ spermatozoa/ml olacak şekilde fertilizasyon medyumunu ile seyreltilen spermatozoa, CRISPR/Cas9 enjekte edilmiş olgun oositlerle birlikte 500 µl fertilizasyon medyumunda %5 CO₂, maksimum nem içeren 38,5°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek fertilizasyon sağlanmıştır.

3.2.2.4. *In vitro* kültür

Fertilize oositlerin (zigotların) blastosist (Day 8: D8) aşamasına kadar gelişimi için yağ bazlı kültür sistemi kullanılmıştır. Kültür için 35 mm'lik petri kabının alt kısmı marker kalem ile 4 parçaya ayrılmış ve her bir parça numaralandırılmıştır. Her bir parça içerisine 12,5 µl SOF (FCS içeren) ile damlalar oluşturulmuş ve petrinin tam ortasından olacak şekilde yaklaşık 4 ml mineral yağ (Nidoil) yavaş yavaş eklenerek damlaların üzerinin kaplanması sağlanmıştır. Oluşturulan damlaların üzerine 12,5 µl SOF daha eklenerek, final hacmi 25 µl olan kültür damlaları ekilibrasyon için inkübatöre konulmuştur.

Yaklaşık 18 saatlik IVF sonrası, kültüre alma işlemine başlamadan önce; kabin açılarak hava akışını optimizasyonu ve kabin içerisindeki 37°C ayarlı ısıtıcı tabla açılarak ısınması sağlanmıştır. Ayrıca, kullanılacak olan 35 mm'lik petri, 15 ml'lik falkon tüp, zigotların yıkama solüsyonlarından (ilk yıkama için euroflush ve son yıkama için SOF kültür medyumunu) alınması sırasında minimum sıvı geçişine izin verecek incelikte bek alevi yardımıyla hazırlanan cam pipetler kabin içerisine alınmıştır.

IVF medyumunu içerisindeki zigotlar üzerindeki sperma kalıntılarının temizlenmesi için 15 ml'lik falkon tüpte 1 ml euroflush içerisine toplanarak 30 sn vortekslenmiştir. Vorteks sonrası zigot kaybını önlemek için hızlı bir şekilde 35 mm'lik petri kabı içerisine dökülmüş ve yine zigot kaybını önlemek için 3-4 kez yaklaşık 1 ml euroflush kullanarak falkon tüp yıkanmış, çalkalanmış ve dökülmüştür. 35 mm'lik petride euroflush içerisinde toplanan zigotlar yıkanıp toplandıktan sonra, son yıkama için SOF kültür medyumuna alınmış ve yıkanmıştır. Her bir kültür damlası içerisinde 20-25 zigot olacak şekilde paylaştırılmış; %5 CO₂, %5 O₂ ve maksimum nem içeren, 38,5°C sıcaklıktaki inkübatörde kültüre alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Muhtemel zigotların SOF besiyeri damlalarında kültürü.

3.2.3. Gelişimsel farklılıklar

Fertilizasyon sonrası kültüre alınan zigotların bölünmeleri gelişimin ikinci gününde (D2) kontrol edilmiştir. Daha sonra 7. günde (D7) her bir grupta elde edilen blastosist adeti sayılmıştır. Sekizinci günde (D8) blastosist sayıları belirlenip, fikse edilmiştir.

3.2.4. Morfolojik analizler

Çiftlik hayvanı türlerinde elde edilen blastosistlerin ilk soy farklılaşmasının analiz edilmesinde farklı soylara özgü belirteçler kullanılarak ekspresyonları embriyoların immün boyanması ile protein düzeyinde incelenebilir (Perez-Gomez vd. 2021). Bu nedenle TE hücre sayısı belirlenmesi için TE soyuna özgü belirteç olan GATA3, ICM hücre sayısı için SOX2, toplam hücre sayısı için ise çekirdek boyası olan DAPI ile immün boyama yapılmıştır. Boyama işlemi aşamaları detaylı olarak aşağıda sıralanmıştır.

3.2.4.1. İmmünohistokimyasal boyama ve görüntüleme

CDX2 hedefli deney grubu (gRNA+Cas9) ve kontrol grubu (Cas9) olmak üzere mikroenjeksiyon yapılan sığır embriyoları CDX2, GATA3 (TE) ve SOX2 (ICM) genlerinin ekspresyonunu saptamak için boyanmıştır. Embriyolar fertilizasyondan sonra gelişimin 8. gününe kadar (D8) kültürde tutulmuştur. Zonadan çıkmış blastosistler ise aşamasına ulaşanlar direkt olarak %4 paraformaldehit (PFA) içerisine alınarak 15 dk fikse edilmiştir. Zona pellusida taşıyanlar ise öncelikle herhangi bir spermatozoa kalıntısından kaçınmak ve sonraki enzimatik sindirimi kolaylaştırmak için asidik PBS (pH:2) içinde yaklaşık 10-15 sn inkübasyon yoluyla zona pellusidalar blastosistlerden uzaklaştırıldıktan sonra (Bermejo-Álvarez vd. 2008) fikse edilmiştir. Fikse edilen örnekler boyama işlemine kadar %1 BSA içeren PBS içerisinde +4°C’de saklanmıştır. Saklama süresi 2 günden fazla olan örnekler paraformaldehitin etkisini geri çevirmek için glisin içerisinde +4°C’de 3-6 saat inkübasyon uygulanmıştır. Inkübasyon sonrası örnekler 500 µl PBS-%1BSA içerisinde 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Hücre geçirgenliği sağlamak amacıyla

%1 triton eklenmiş 500 µl PBS-% 1 BSA içeren permeabilizasyon solüsyonu içerisinde 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bloklama için %10 FBS, %0,2 tween20 içeren 300 µl PBS-%1BSA içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sırada boyama yapılacak genler için belirlenen primer antikorların her biri 300 µl bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edilerek karışım elde edilmiştir. Kullanılan primer antikorlara ait detaylı bilgiler Çizelge 3.13'te gösterilmiştir. Bloklama sonrasında örnekler primer antikorların karışımı ile gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında buharlaşmayı minimuma indirmek için örneklerin bulunduğu her bir kuyunun üzeri ve kuyulu plakanın kenarı parafilmle sarılarak kapatılmıştır.

Çizelge 3.13. Boyamalarda kullanılan primer antikorlar.

Primer AB	Taşıyıcı Tür	Referans	Dilüsyon Oranı
CDX2	Fare	Biogenex MU392A-UC	1:100
GATA3	Tavşan	Abcam ab199428	1:100
SOX2	Rat	İnvitrogen 14-9811	1:100

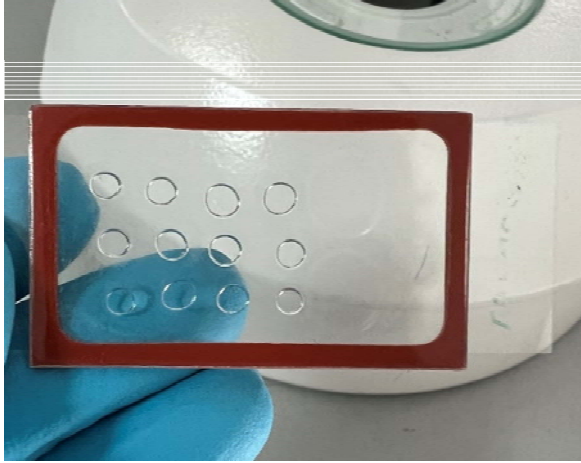
Tüm örnekler 4 kez PBS-%1 BSA içerisinde 10 dk boyunca yıkanmıştır. Son yıkama sırasında primer antikorlara uygun olarak seçilen sekonder antikorların her biri 6 µl DAPI içeren 300 µl bloklama solüsyonu içerisinde dilüe edilerek karışım elde edilmiştir. Sekonder antikorlar ışığa duyarlı olduğu için karışımın hazırlanması aşamasından itibaren olmak üzere sonraki işlemler mümkün olduğunca ışısız ve karanlık ortamda yapılmaya çalışılmıştır. Kullanılan sekonder antikorlara ait detaylı bilgi Çizelge 3.14'te gösterilmiştir. Yıkamalar sonrasında örnekler sekonder antikorların karışımı ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.14. Boyamalarda kullanılan sekonder antikorlar

Sekonder AB	Host	Hedef	Dilüsyon Oranı
647	Eşek	Fare	1:300
488	Eşek	Tavşan	1:300
594	Eşek	Rat	1:300

*Boyama sonucu görülen renkler; 647: beyaz, 488: yeşil, 594: kırmızı.

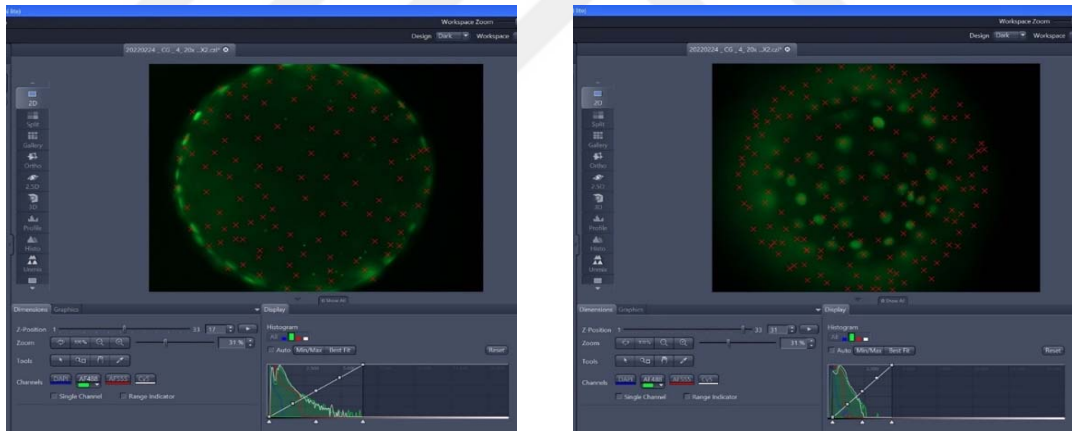
Görüntüleme öncesi boyanmış örneklerle son yıkamalar (3 kez, 10 dk 500 µl PBS-%1 BSA ile) yapılarak, slide üzerine mikrodamlar oluşturmak için PAP-pen kalem (Kisker Biotech GmbH) ile çemberler çizilmiştir. Her bir çember üzerine 8 µl PBS-%1 BSA ile mikrodamlar oluşturulmuş ve tek tek embriyolar bu damlalara konulmuştur (Şekil 3.6). Görüntüleme için ZEISS floresan ters mikroskop (Zeiss Axio Observer_Apotome-2) kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Her bir blastosistin görüntülenmesi için hazırlanan preparatlar.

3.2.4.2. Hücre sayımı

Görüntüler, çift hücre sayımını önlemek için bir görüntü yığınındaki her slaytın ayrı ayrı incelenebildiği ZEN (Zeiss) yazılımı ile analiz edilmiştir. Toplam hücre sayısı, DAPI ile boyanan tüm çekirdekler sayılarak belirlenmiştir. TE ve ICM hücrelerinin sayısının belirlenmesi için sırasıyla CDX2, GATA3 ve SOX2 genleri boyanan çekirdekler sayılmıştır. Örnek olarak farklı slaytlarda TE (GATA3+) hücre sayılarının belirlenmesi Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Zeiss marka mikroskopta ZEN yazılımı ile aşamalı olarak farklı slaytlar üzerinde blastosist hücrelerinin (yeşil daireler) işaretlenerek (kırmızı noktalar) sayımı.

3.2.5. Genotipleme

3.2.5.1. DNA izolasyonu

Gen düzenlenmiş embriyoların sekansa hazırlanması için ilk olarak blastosistlerden DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu için ticari kit (Arcturus

Picopure DNA Ekstraksiyon Kit- Thermo 01050943) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için kit içerisindeki liyofilize haldeki proteinaz K 155 µl distile su eklenerek hazırlanmıştır. Her bir embriyo örneğinin üzerine 8 µl proteinaz K eklenmiştir. PCR cihazına konulan örnekler proteinaz K'nın aktivasyonu için 1 saat boyunca 65°C sıcaklık uygulanmış olup, daha sonra proteinaz K'nın inaktivasyonu için 10 dk 95°C sıcaklık uygulanmıştır. Örneklerin sıcaklığının 8°C'ye düşmesi beklendikten sonra cihazdan alınan örnekler ile kütüphane hazırlanmaya başlanmıştır.

3.2.5.2. Kütüphane hazırlanması

Gen düzenlenmiş örneklerin genotiplenmesi için Yeni Nesil Dizilime metodlarından biri olan MiSeq illumina yöntemi kullanılmıştır. Bu sekanslama yöntemi için örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak kütüphanelerinin hazırlanmasında AMPure XP (boncuklar) (Beckman Coulter, A63880) kit kullanılmıştır. Bu kit ile kütüphanenin hazırlanması temel olarak 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama klasik PCR ile DNA örneklerinin amplifikasyonu ve elde edilen PCR ürünlerinin pürifikasyonu, ikinci aşama ise indeks eklenen ürünlerin tekrar PCR ile çoğaltılması ve elde edilen indeksli PCR ürünlerinin pürifikasyonunu içermektedir. Bu iki aşamaya ait detaylı işlemler adım adım aşağıda sıralanmıştır.

İlk PCR için kullanılan çözeltiler ve miktarları Çizelge 3.15'te verilmiştir. Ayrıca Çizelge 3.16' de PCR koşulları detaylandırılmıştır.

Çizelge 3.15. DNA kütüphanesi oluşturmak için 1. aşama PCR karışımı

Bileşenler	Miktar (µl)	Konsantrasyon
DNA	2,00	
Buffer (5x)	5,00	1x
MgCl ₂	2,00	2 mM
dNTPs	0,25	0,1 mM
Primer F	0,50	0,2 µM
Primer R	0,50	0,2 µM
Taq Polimeraz	0,20	0,2 u
H ₂ O	15,00	
Toplam	25,00	

Çizelge 3.16. DNA kütüphanesi oluşturmak için 1. aşama PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Öndenatürasyon	96	20 sn	1x
Denatürasyon	96	20 sn	32x
Bağlanma	60	20 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1x
	8		∞

Birinci aşama PCR reaksiyonlarından sonra amplifikasyon ürünlerini ilk saflaştırma (pürifikasyon 1) işlemine geçilmiştir. Temizleme işlemi için AMPure XP manyetik boncukları kullanılmıştır. Temizleme işlemine başlamadan önce taze %80'lik ETOH hazırlanmıştır ve AMPure XP boncukları oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla;

1. PCR ürünlerini santrifüj edilerek ve çok kanallı pipet (25 µl) ile 96 kuyulu plaka içerisine aktarılmıştır.
2. AMPure XP boncukları 30 sn vortekslenmiştir. Tüm rnekler için gerekli AMPure XP boncuk hacmi ependorf tüp içerisine alınmıştır.
3. Çok kanallı pipetle her bir örnek üzerine 20 µl AMPure XP boncuk eklenmiştir.
4. Total hacim (45 µl) yaklaşık 10 kez pipetlemeyle karıştırılmıştır.
5. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Plaka 2 dk veya süpernatant temizlenene kadar manyetik stand üzerine yerleştirilmiştir.
7. Plaka manyetik standın üzerindeyken süpernatant çekilmiştir.
8. %80 ETOH ile yıkama:
 - a. Her bir örnek üzerine 200 µl %80 ETOH eklenmiştir.
 - b. 30 sn inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatantı ekilmiştir.
9. İkince kez %80 ETOH ile yıkama:
 - a. 200 µl %80 ETOH eklenmiştir.
 - b. 30 sn inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatant çekilmiştir.
 - d. İnce uçlu pipet kullanarak tüm ETOH kalıntısını çekilmiştir.
10. Manyetik plaka üzerinde örneklerin bulunduğu plaka ile boncukları kurumaya bırakılmıştır (10 dk).
11. Plaka manyetik standdan çıkarılmış ve her bir örneğe 52,5 µl Tris (10 mM, Ph:8.5) eklenmiştir.
12. Her bir rneği yaklaşık 10 kez pipetleme yaparak karıştırılmıştır (Bu aşamada boncukların iyice karıştırıldığından emin olunmalıdır)
13. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
14. Plakayı 2 dk veya süpernatant temizlenene kadar manyetik stand üzerine yerleştirilmiştir.
15. 50 µl süpernatant yeni bir plaka içerisine aktarılmıştır.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra ticari kit kullanılarak indekslerin takılması işlemine (indeks PCR) geçilmiştir. Kit içerisinde bulunan 2 farklı primer indeksi kullanarak PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu indekslerden biri A'dan H'ye kadar harflendirilmişken (a) diğeri 1'den 12'ye kadar numaralandırılmıştır (b). Bu indekslerde her bir harf ve her bir numara bir primeri temsil etmektedir. Böylece bir harf bir numara ile eşleştirildiğinde PCR'da kullanılmak üzere bir çift primer elde edilmiştir. Her bir indeksin primer dizisi izelge 3.17'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. İndeks PCR’da kullanılan primer dizileri.

İndeks 1	Primer	İndeks 2	Primer
1	TAAGGCGA	A	TAGATCGC
2	CGTACTAG	B	CTCTCTAT
3	AGGCAGAA	C	TATCCTCT
4	TCCTGAGC	D	AGAGTAGA
5	GGAATCCT	E	GTAAGGAG
6	TAGGCATG	F	ACTGCATA
7	CTCTCTAC	G	AAGGAGTA
8	CAGAGAGG	H	CTAAGCCT
9	GCTACGCT		
10	CGAGGCTG		
11	AAGAGGCA		
12	GTAAGGGA		

1. Çizelge 3.17’de detayları verilen primerler hazırlanmıştır.
2. PCR için gerekli temel karışım hazırlanmıştır. Karışıma ait detaylar Çizelge 3.18’de verilmiştir.
3. Her bir tüpe 35 µl temel karışımdan eklenmiştir.
4. Her tüpe karşılık gelen iki indeksten 5’er µl eklenmiştir.
5. Her tüpe karşılık gelen PCR1-Pürifikasyon 1 ürününden 5 µl eklenmiştir.
6. 10x pipetlemeyle karıştırılmıştır.
7. Santrifüj edilip, PCR işlemi başlatılmıştır. PCR koşulları Çizelge 3.19’da verilmiştir.

Çizelge 3.18. DNA kütüphanesi oluşturmak için ikinci aşama indeks PCR bileşenleri.

Çözelti	Bileşen	Miktar (µl)
Temel Karışım	Buffer (5x)	10,0
	MgCl ₂	4,0
	dNTP	0,5
	Taq Polimeraz	0,4
	H ₂ O	20,0
İndeksler	İndeks 1 ve 2	5,0
DNA	PCR 1-Pür.1 ürünü	5,0
	Toplam	50,0

Çizelge 3.19. DNA kütüphanesi oluşturmak için ikinci aşama indeks PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Öndenatürasyon	95	3 dk	1x
Denatürasyon	95	30 sn	8x

(Devamı arkada)

Çizelge 3.19'un devamı

Bağlanma	55	30 sn	8x
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1x
	4		∞

İndeks PCR ürünlerinin saflaştırılması (pürifikasyon 2) başlamadan önce taze %80'lik ETOH hazırlanmıştır ve AMPure XP boncuklarını oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra aşağıda sıralanan işlemler gerçekleştirilmiştir.

1. PCR ürünleri santrifüj edilerek ve çok kanallı pipet (50 µl) ile plakaya (eğer PCR tüplerinde yapıldıysa) transfer edilmiştir.
2. AMPure XP boncukları 30 sn vortekslenmiştir. Tüm örnekler için gerekli AMPure XP boncuk hacmi ependorf tüp içerisine alınmıştır (56 µl x numune sayısı + 10 µl).
3. Çok kanallı pipetle 56 µl AMPure XP boncuk eklenmiştir.
4. Total hacmi (106 µl) 10x pipetlemeyle karıştırılmıştır.
5. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Plaka 2 dk veya süpernatant temizlenene kadar manyetik stand üzerine yerleştirilmiştir.
7. Plaka manyetik standın üzerindeyken süpernatant çekilmiştir.
8. %80 ETOH ile yıkama:
 - a. 200 µl %80 ETOH eklenmiştir.
 - b. 30 sn inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatant çekilmiştir.
9. İkinci kez %80 ETOH ile yıkama:
 - a. 200 µl %80 ETOH eklenmiştir.
 - b. 30 sn inkübe edilmiştir.
 - c. Süpernatant çekilmiştir.
 - d. İnce uçlu pipet kullanarak tüm ETOH kalıntısı iyice çekilmiştir.
10. Manyetik plaka üzerinde plaka ile boncukları kurumaya bırakılmıştır (10 dk).
11. Plaka manyetik standdan çıkarılarak ve her bir numuneye 27,5 µl Tris (10 mM, Ph:8,5) eklenmiştir.
12. Her bir örneği 10x pipetleme yaparak karıştırılmıştır (Bu aşamada boncukların iyice karıştırıldığından emin olunmalıdır).
13. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
14. Plakayı 2 dk veya süpernatant temizlenene kadar manyetik stand üzerine yerleştirilmiştir.
15. 25 µl süpernant, yeni bir plakaya aktarılmıştır.
16. Nanodrop ile konsantrasyonlar ölçülmüştür.

Her bir örneğin konsantrasyonuna göre gerekli hesaplamalar (Formül 3.1) yapılarak son konsantrasyonları 5 nM olacak şekilde Tris (10 mM, pH:4,5) kullanılarak seyreltilmiştir. Örnekler sekanslama cihazında tek bir şeritte okutulacağı için her bir örnekten 10 µl alınarak bir ependorf tüp (1,5 ml) içerisinde birleştirilmiştir. Sekanslama işlemi Illumina miSeq platformu ile gerçekleştirilmiştir. Sekans sonucunda gelen

dosyalar Phyton yazılımı ile analiz edilmiştir. İlk olarak kalite filtrelemesi (QC) yapılmış olan sonuçlar, referans sekans (WT) ile eşleştirilerek her bir blastosist örneğinin taşıdığı allel(ler), bu allellerin yüzdeleri belirlenmiştir. Çerçeve kayması mutasyonu (3n+1 veya 3n+2) oluşan allelin yanı sıra WT ve/veya çerçeve kayması mutasyonu oluşmamış (3 baz çifti ve katları) allel taşıyan blastosistler CDX2 geni düzenlenmiş ancak KO olmayan (CDX2 NKO) olarak değerlendirilirken, tamamen çerçeve kayması mutasyonu içeren allel(ler)e sahip blastosistler CDX2 geni için KO olarak değerlendirilmiştir. Son olarak CDX2 geni için genotipleri (WT, NKO, KO) belirlenen blastosistlerin detaylı morfolojik analizleri yapılmıştır.

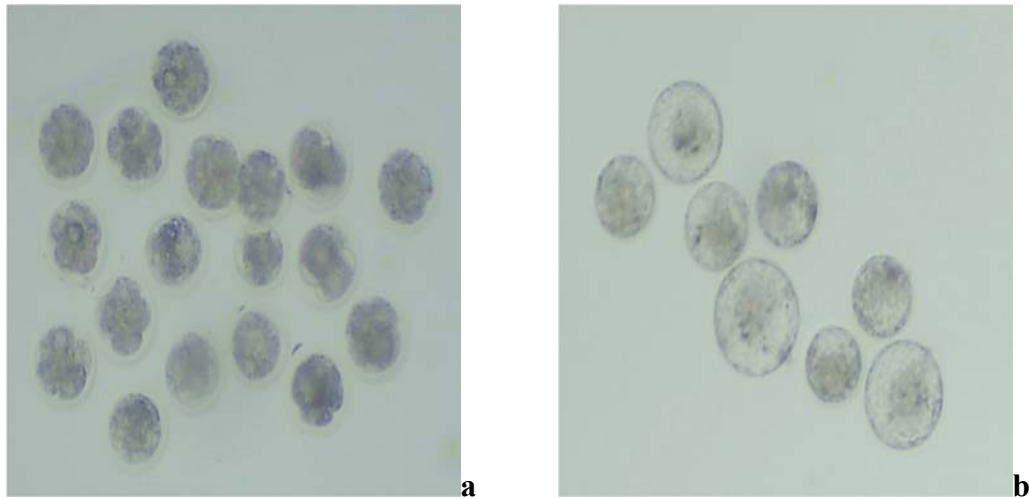
$$\frac{\text{amplikon konsantrasyon (ng/}\mu\text{l)}}{660\text{g/mol} \times \text{amplikon uzunluğu (bp)}} \times 10^6 = \text{konsantrasyon (nM)} \quad (3.1)$$

4. BULGULAR

Tez kapsamında CDX2 geni susturulmuş (KO) sığır blastosisti elde etmek için yapılan 8 bağımsız deneme tekrarı kapsamında toplam 871 oosit (276 kontrol ve 595 deney gurubu) ile çalışılmıştır. Kontrol gurubunda 276 oositte 207'si ve deney grubunda 595 oositte 478'i hücre bölünmesine başlamıştır. Hücre bölünmesine başlayan oositlerden 83 adeti kontrol gurubunda ve 132 adetinin de deney grubunda blastosist aşamasına geçtiği belirlenmiştir. Sonuçta blastosist aşamasına ulaşan değerlendirilebilir toplam 215 blastosist (kontrol ve deney grubu) elde edilmiştir. Bu blastosistlerde mikroenjeksiyon yoluyla gRNA+Cas9 uygulanan (deney grubu) oositlerin gelişimsel farklılıkları hücre bölünmesi ve blastosist oranları ile belirlenmiştir. Ayrıca, CDX2 geni susturulmuş hücreleri belirlemek için iç hücre kitlesi (ICM) SOX2 ile, trofektoderm (TE) GATA3 ile ve toplam hücre sayısı ise DAPI ile boyanarak morfolojik analizler yapılmıştır. Ayrıca, blastosistlerde CDX2 geninin hedeflenen DNA sekansının belirlenerek genotiplendirme gerçekleştirilmiştir. Bütün bulgular değerlendirilerek CDX2 geninin susturulmasının embriyo gelişiminde bir farklılığa sebep olup olmadığı yorumlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular aşağıda alt başlıklar halinde sıralanmıştır.

4.1. Gelişimsel farklılıklar

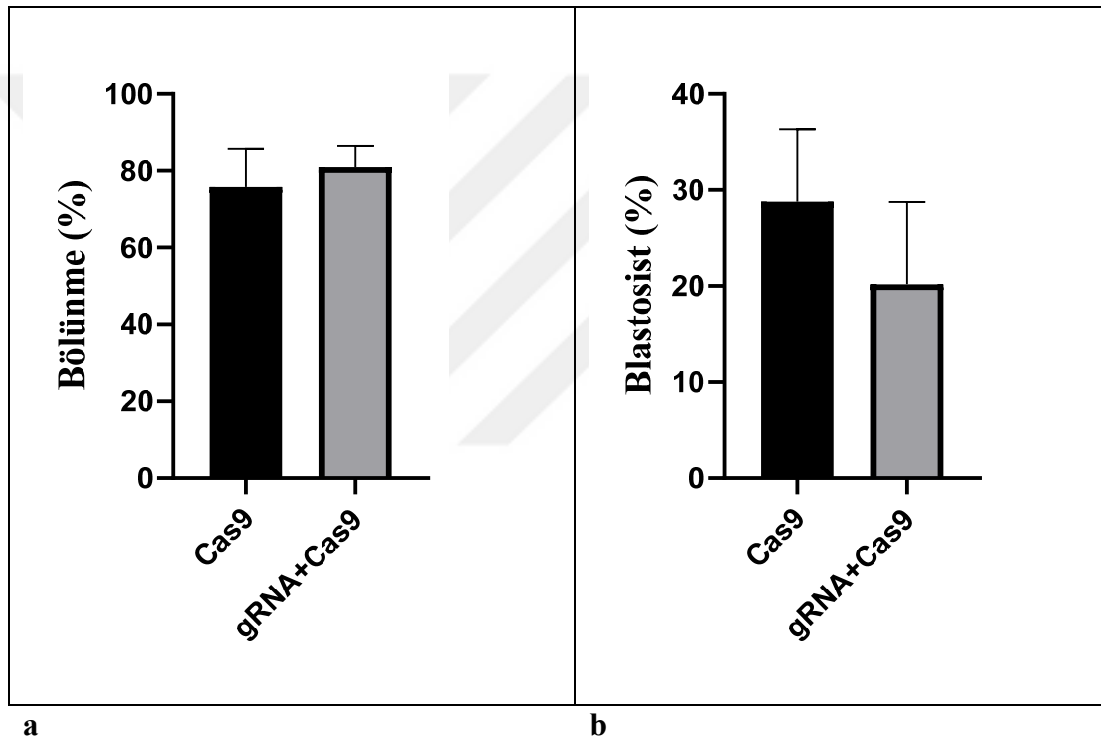
Sığır preimplantasyon gelişiminde rol oynadığı düşünülen CDX2 geninin fonksiyonu kontrol (Cas9) ve deney grubunda (gRNA+Cas9) embriyoların gelişim potansiyelleri değerlendirilerek test edilmiştir. CDX2 hedefli gRNA+Cas9 enjekte edilen oositlerin fertilizasyon sonrası kültüre edildikten sonra 2. gün bölünmeye başlayanlar (zigot oluşturanlar), gelişimin 7. gününde ise blastosist aşamasına ulaşanlar mikroskop (4x) altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.a,b).



Şekil 4.1. Preimplantasyon gelişiminde a) hücresel bölünmeler ve b) blastosistler

Kontrol grubunda 276 adet oosite mikroenjeksiyon ile Cas9 enjekte edilmiş ve bu oositlerin $75,78 \pm 3,52$ 'lik bir hücre bölünmesi oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Deney grubunda ise 595 adet oosite mikroenjeksiyon ile gRNA+Cas9 enjeksiyonu yapılmış ve bu oositlerin $80,96 \pm 1,95$ oranında hücre bölünmesi sahip olduğu tespit edilmiştir. Hücre bölünme oranlarına dayalı olarak kontrol ve deney grupları bağımsız gruplar t-testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.2.a).

Kontrol grubundaki oositlerin $28,07 \pm 7,51$ 'i blastosist aşamasına ulaştığı, deney grubunda ise bu oranın $20,19 \pm 8,56$ olduğu gözlemlenmiştir. Her iki grup içinde blastosist oluşturma oranlarının normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bağımsız gruplar t-testi sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.2.b).



Şekil 4.2. Gelişimsel farklılıklar **a)** Zigotların bölünme oranları **b)** 8. günde blastosist oranları

4.2. Morfolojik analizler

Sığır preimplantasyon gelişiminde etkili olduğu düşünülen CDX2 geninin işlevi kontrol ve deney gruplarındaki blastosist (D8) aşamasına ulaşan embriyoların morfolojik değerlendirmesi için immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Kontrol grubundaki blastosistlerin her birinde CDX2 gen ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.a). Bu sonuç, kontrol grubundaki blastosistlerin Cas9 enjeksiyonundan etkilenmediğini ispatlamıştır. Ancak, gRNA+Cas9 (CRISPR) enjeksiyonu ile hedeflenen

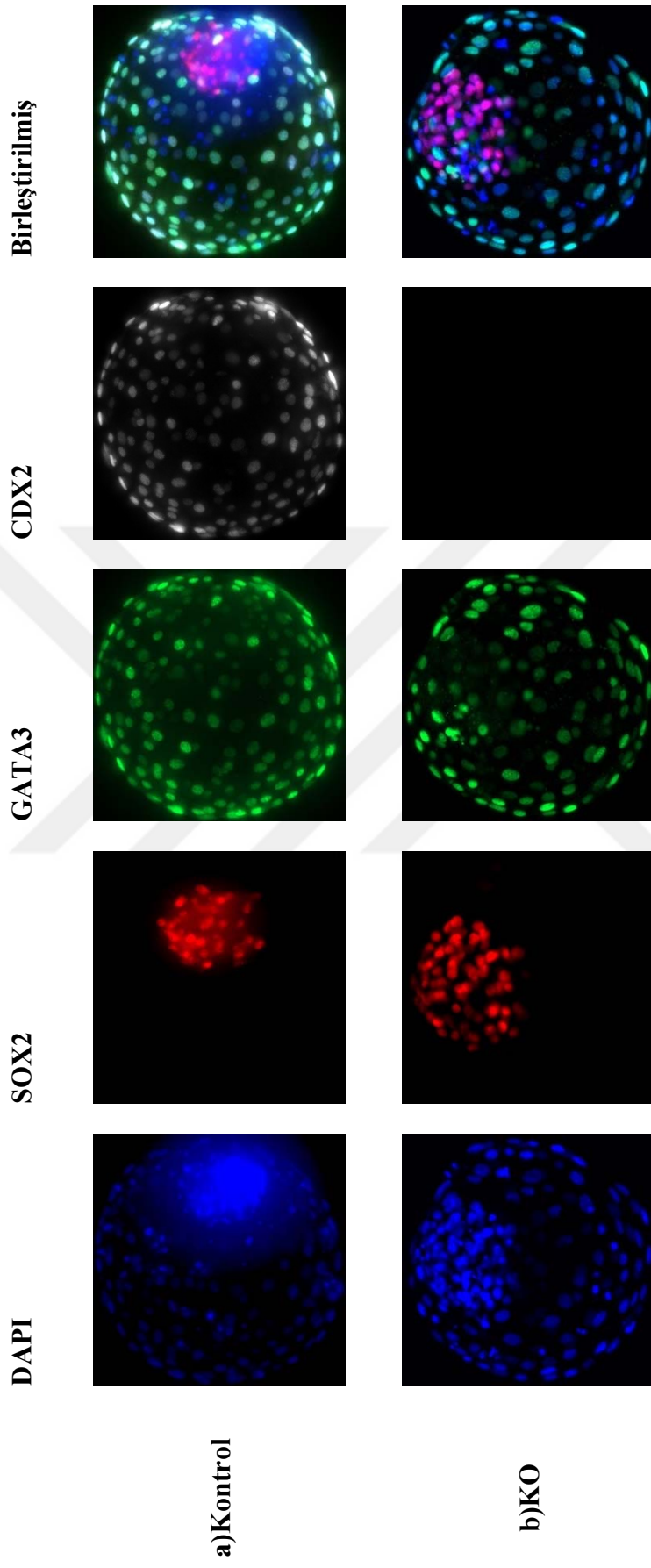
gen susturma hedefine ulaşılmış ve deney grubundaki blastosistlerde CDX2 gen ifadesinin üç farklı boyama modeli ile gösterilen sonuçları elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla şu şekildedir:

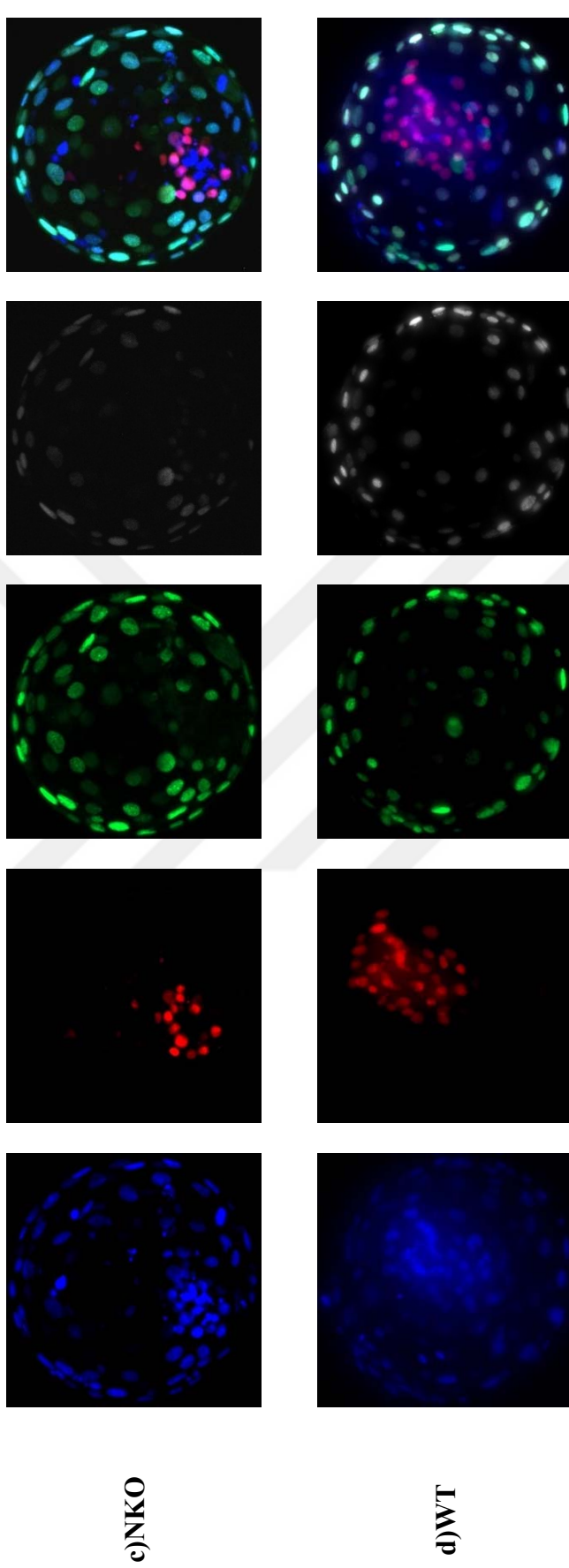
1) Bazı blastosistlerin TE hücrelerinin hiç birinde CDX2 gen ifadesi görülmemiştir (Şekil 4.3.b). Bu sonuç, CDX2 geninin başarılı bir şekilde susturulmasına (KO) bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceğinden dolayı gen bölgesinin DNA sekans analizleri yapılarak genotipler de belirlenmiştir.

2) Bazı blastosistlerin TE hücrelerinin bir kısmında CDX2 gen ifadesi gözlenmezken, bir kısmında zayıf bir gen ifadesi olduğu görülmüştür. Bu durum ise bu boyama modeline sahip blastosistlerin genotipik olarak mozaik (heterozigot genotip: NKO) olduğu ve CDX2'nin kısmen susturulmasına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür (Şekil 4.3.c). Bu nedenle, CRISPR başarısının belirlemek için CDX2 gen bölgesinin DNA sekans analizleri yapılmış ve genotipler belirlenmiştir.

3) Bazı embriyolarda gRNA+Cas9 enjeksiyonu yapılmasına rağmen tıpkı kontrol grubundaki embriyolarda TE hücrelerinde gözlemlenen boyanma modeli gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3.d). Bu sonuç böyle hücrelerde CDX2 geninin susturulamadığını (WT) düşündürmüştür. Be sebeple, CDX2 gen bölgesinin DNA sekans analizleri yapılmış ve genotipler belirlenmiştir.

Genel olarak bakıldığında blastosistler CDX2 gen ifadesi bakımından hangi boyama modeline (KO, NKO veya WT) sahip olursa olsun, blastosöl (yani normal TE genişlemesi) ve trofektodermde GATA3 ekspresyonu sergileyen normal morfoloji gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).





Şekil 4.3. CRISPR uygulanmış deney grubunda ve uygulanmamış kontrol grubunda blastosistlerin çekirdek boyası ve farklı antikorlarla boyanarak hücre sayılarının belirlenmesi.

DAPI: Blastosistin içerdiği oplam hücre sayısını belirlemek için bir çekirdek boyası olan DAPI ile boyanan hücreler mavi renkte görülmektedir. SOX2: İç hücre kitlesindeki (ICM) hücre sayısını belirlemek için Sox2 proteinin antikorları ile boyanması sonucu hücreler kırmızı renkte görülmektedir. GATA3: Trofektoderm (TE) hücre sayısını belirlemek için Gata3 proteinin antikorları ile boyanması sonucu hücreler yeşil renkte görülmektedir. CDX2: CDX2 gen ifadesini belirlemek için Cdx2 proteinin antikorları ile boyanması sonucu TE hücreleri beyaz renkte görülmektedir.

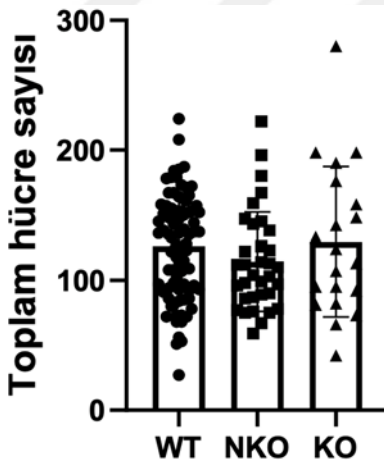
(CDX2 WT, n=83) hem de deney grubunda (CDX2 WT, NKO, KO sırasıyla n=2, n=34, n=20) bulunan her bir blastosiste toplam hücre sayımı (DAPI ile boyanarak), ICM hücreleri (SOX2 için boyanarak) ve TE hücreleri (GATA3 için boyanarak) sayılmıştır (Çizelge 4.2). CDX2 için WT, düzenlenmiş KO olmayan (NKO) ve KO genotipler hem toplam hemde farklı hücre soylarına ait hücre sayıları bakımından karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.3. Farklı genotiplere ait toplam, ICM ve TE hücre sayıları.

Grup	Genotip	Toplam hücre sayısı	ICM (SOX2+)	TE (GATA3+)
Kontrol (Cas9)	WT (n=83+2*)	126,4±4,37	30,11±1,61	96,30±4,14
Deney (gRNA+Cas9)	NKO(n=32)	114,3±6,52	32,65±2,75	81,62±5,40
	KO(n=20)	129,7±12,90	40,25±4,84	89,40±11,52

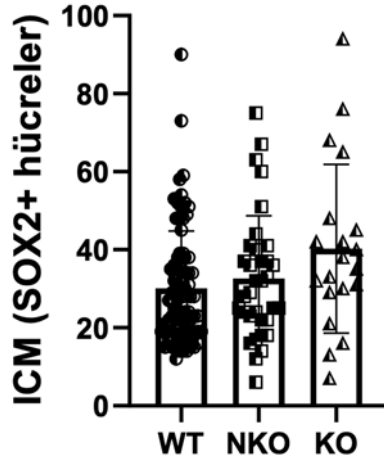
*Deney grubunda olmasına rağmen WT genotipte olduğu belirlenen örnekler.

CDX2 WT, NKO ve KO genotipteki örneklerin toplam hücre sayıları sırasıyla 126,4±4,37, 114,3±6,25 ve 129,7±12,90 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). GraphPad Prism yazılımında normal dağılım gösterdiği belirlenen genotiplere ait hücre sayıları tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve genotipler arasında toplam hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).



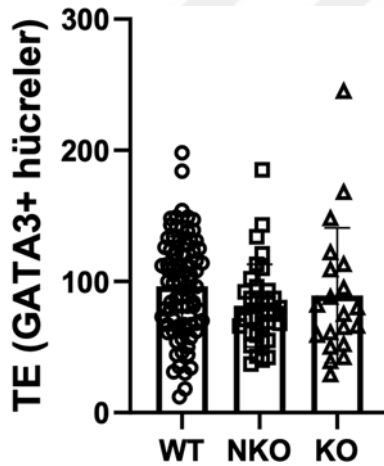
Şekil 4.4. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin toplam hücre sayıları.

CDX2 WT, NKO ve KO genotipteki blastosistlerin ICM hücre sayıları (SOX2+) sırasıyla 30,11±1,61, 32,65±2,75 ve 40,25±4,84 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Normal dağılım göstermemeleri nedeniyle parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılan genotipler arasında ICM hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin ICM (SOX2+) hücre sayıları.

CDX2 WT, NKO ve KO genotipteki blastosistlerin TE hücre sayıları (GATA3+) sırasıyla $96,30 \pm 4,14$, $81,62 \pm 5,40$ ve $89,40 \pm 11,52$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Normal dağılım gösterdiği belirlenen genotiplere ait hücre sayıları tek yönlü ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve genotipler arasında TE hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. CDX2 WT, NKO ve KO genotipe sahip blastosistlerin TE (GATA3+) hücre sayıları.

5. TARTIŞMA

Memeli preimplantasyonu embriyo gelişiminde ilk hücre soyu farklılaşması blastosist oluşumu ile eşzamanlı olarak gerçekleşen TE ve ICM hücre soylarıdır. ICM, embriyonik hücreler ve ekstaembriyonik endoderm öncüsü iken TE plasenta öncüdür (Pedersen vd. 1986; Fleming 1987). Bu hücre soylarının kurulumu gebeliğin şekillenmesi ve devamlılığının sağlanması bakımından önemlidir (Piliszek vd. 2016; Pérez-Gómez vd. 2021; Sawai 2021). Model organizma olarak kullanılan farelerde bu süreç yapılan birçok çalışma ile detaylı bir şekilde araştırılmış olsa da sığır da dahil olmak üzere çiftlik hayvanı türlerinde bilgi eksikliği bulunmaktadır (Berg vd. 2011; Wu ve Schöler, 2014; Simmet vd. 2018, Sawai 2021). Alandaki bilgi eksikliğinin giderilmesi yardımcı olmayı hedefleyen bu tez çalışmasında sığır preimplantasyon embriyo gelişimine etki ettiği bilinen CDX2 geni konu edinilmiştir.

Sığırlarda yardımcı üreme teknikleri kullanılarak oluşturulan gebeliklerde *in vivo* ve *in vitro* kökenli embriyolar karşılaştırıldığında *in vitro* kökenli embriyolardan oluşturulan gebeliklerde plasental yetersizliklerden kaynaklanan erken gebelik kayıpları yaygındır (Lonergan vd. 2006; Giossis ve Cibelli, 2014a; Ramos-Ibeas vd. 2019b). TE hücrelerinin plasenta öncüsü olduğu ve dolayısıyla fetüs beslenmesi ve gebeliğin devamlılığının sağlanması bakımından önemli olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu hücre soyunda etkili olan faktörlerin anlaşılması gebeliklerde görülen sorunların anlaşılması sağlanabilir (Farin vd. 2006). Tamamlanan bu tez çalışmasında da fare embriyolarının preimplantasyon gelişimi sırasında TE/ICM hücre soyu farklılaşması için gerekli olduğu bilinen bir TE trapkripsiyon faktörü olan CDX2 geninin (Strumpf vd. 2005) sığır preimplantasyon embriyo gelişimi üzerindeki rolü araştırılmıştır.

CRISPR teknolojisinin keşfi sonrası uygulanabilirliğinin kolay olması, yüksek verimliliği, KO elde edilebilmesi gibi birçok avantajı nedeniyle yoğun olarak tercih edilmektedir (Lamas-Toranzo vd. 2018). Bu bağlamda sığır preimplantasyon embriyo gelişiminde CDX2 geninin etkisinin araştırıldığı bu tez çalışmasında gen susturulması için CRISPR yöntemi kullanılmıştır.

Tez projensinin ana fikri sığırlarda embriyonik kayıpları önlemek için sebeplerini aydınlatmaya çalışmaktadır. Bu amaçla CDX2 geninin başarılı bir embriyo gelişiminde rolü olup olmadığı bu tez çalışmasının konusu olmuştur. CDX2 geni sığırlarda blastosist gelişimi için gerekli ise bu gen mutasyonlarının gelişimi olumsuz yönde etkilemesi beklenir. Goissis ve Cibelli (2014b), CDX2 geninin knock-down (KD) edilmesi amacıyla bu geni hedefleyen siRNA'ların, karıştırılmış (SCR) siRNA'ların sığır zigotlara mikroyenjeksiyonu ve enjekte edilmeyen kontrol grubunda bölünme ve blastosist oranlarını karşılaştırmışlardır. Mikroyenjeksiyon yapılan gruplarda (siRNA için %61,84, SCR için %61,82) kontrol grubuna (%75,49) göre bölünme oranında anlamlı bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında ise CDX2 hedefli gRNA+Cas9 ile enjekte edilen deney grubu ile Cas9 enjekte edilen kontrol grubu arasında bölünme oranları (deney grubu: %80,96, kontrol: %75,78) bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.a). Gioissi ve Cibelli'nin çalışmasından farklı olarak kontrol grubunda benzer oranda bölünme gözlemlenmiş olması bu araştırmacıların çalışmasında

görülen azalmış bölünme oranının mikroenjeksiyonun öldürücü etkisinden kaynaklandığını işaret edebilir.

Goissis ve Cibelli (2014b)'nin yaptıkları çalışmada CDX2 geni knock-down (KD) edilen embriyolarda önemli oranda bir protein kaybı (%78) görülmesine rağmen bu grupta %35,34, SCR grubundaki ise %33,34, mikroenjeksiyon yapılmayan kontrol grubunda (%38,34) oranında blastosist (D7,5) elde etmişlerdir. Blastosist oluşturma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Aynı şekilde, Sakurai vd., (2016) tarafından siRNA'lar ile CDX2 genini immunohistokimyasal boyamalar ile tespit edilemeyecek oranda aşağı-regüle etmelerine rağmen kontrol grupları ile CDX2-KD grubu arasında blastosist (D8) aşamasına ulaşma oranları bakımından bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalar ile benzer şekilde tamamlanan bu tez çalışmasında elde edilen bulgular WT genotipe sahip blastosistleri içeren kontrol grubu ile farklı genotiplere sahip (CDX2 WT, NKO, KO) blastosistlerin olduğu deney grubu arasında blastosist (D8) aşamasına ulaşma oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (Şekil 4.2.b). Hem CDX2-KD gruplarda hem de KO gruplarda blastosist oluşturma oranlarının azalmaması CDX2 nin blastosist oluşumu dolayısıyla TE/ICM farklılaşmasında vazgeçilebilir olduğu söylenebilir.

Memeli blastosistlerinde görülen hücre soylarının herhangi birinde hücre sayısının olmaması veya azalması, gelişimin ilerleyen dönemleri üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu ve olumsuz etkilenen bu embriyoların implante olsa dahi gelişimini devam ettiremedikleri bilinmektedir (Feldman vd. 1995; Nichols vd. 1998; Mitsui vd. 2003; Chawengsaksophak vd. 2004; Ralston ve Rossant 2008; Kang vd. 2013; Schrode vd. 2014; Wicklow vd. 2014). Ayrıca toplam hücre sayısı blastosist kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Arat vd. 2015). Bu nedenle erken gelişimin araştırıldığı çalışmalarda toplam hücre sayısı ve her bir soya ait hücre sayısı değerlendirilen parametreler arasındadır. Bu kapsamda, morfolojik analizler ile CDX2 bakımından farklı genotiplere sahip (WT, NKO, KO) blastosistlerin (D8) toplam hücre sayıları incelendiğinde CDX2 geninin KO edilmesinin anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmektedir (Şekil 4.4). Aynı şekilde, CDX2-KD blastosistlerin de (D7,5) toplam hücre sayılarının etkilenmediği Goissis ve Cibelli (2014b) tarafından gösterilmiştir. Ancak bunların aksine Sakurai vd. (2016) tarafından CDX2-KD blastosistlerde gelişimin 7. gününde (D7) toplam hücre sayısının CDX2-WT (kontrol grubu) genotipteki blastosistlere göre azaldığı bildirilmiştir. *In vitro* embriyo üretiminin her bir aşamasında (IVM, IVF, IVK) kullanılan medyumların hücre sayıları üzerinde etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu toplam hücre sayısındaki azalmanın CDX2-KD edilmesinden öte kullanılan medyumlardan kaynaklanmış olabilir. Dahası hem tamamlanan tez çalışmasında hem de Goissis ve Cibelli (2014b) tarafından CDX2-KO ve/veya CDX2-KD edilmesinin toplam ve farklı hücre soylarına (TE, ICM) ait hücre sayılarını (SOX2+, GATA3+) değiştirmedığı görüldüğünden Sakurai vd. (2016) tarafından bildirilen azalmış toplam hücre sayısının kullanılan medyumlardan etkilenmiş olma ihtimalini artırmaktadır. Bu nedenle, CDX2-KD veya KO olmasının blastosistlerde toplam hücre sayısını etkilemediği söylenebilir.

TE hücrelerindeki azalma, embriyonik gelişim sırasındaki plasental anormallikler ile ilişkili olabilir (Koo vd. 2002, Wang vd. 2011, Arat vd. 2015). Dahası, TE soyunun kurulamaması, implantasyonda başarısızlığa yol açmaktadır (Chawengsaksophak vd. 2004; Strumpf vd. 2005). İmmünohistokimyasal boyamalar ile yapılan morfolojik analizlerde CDX2 negatif hücrelerin hala TE'e katkıda bulunduğunu gözlemlenmektedir, bu da TE oluşumunun CDX2 gerektirmeyebileceğini ve proteininin blastosist oluşumu için gerekli olmadığını düşündürmektedir (Şekil 4.4). Bu kapsamda, farklı genotiplere (WT, NKO ve KO) sahip blastosistler arasında TE hücre sayısı (GATA3+) bakımından farklılıklar incelendiğinde CDX2'nin KO edilmesinin anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmektedir (Şekil 4.6) Önceki raporlar da CDX2 geninin KD edilmesi durumunda TE hücre sayısının bu durumdan etkilenmediğini göstermektedir (Giossis ve Cibelli 2014b). Tüm bu sonuçlar CDX2'nin TE'nin farklılaşması için gereklilik göstermediğini işaret etmektedir.

Kemirgen embriyolarında, GATA3 yalnızca TE'de eksprese edilmektedir ve CDX2 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek TE'nin farklılaşmasında işlev görmektedir (Home vd. 2009; Ralston vd. 2010). Buna uygun olarak, sığır embriyolarında da GATA3, yalnızca TE soyunda ifade edilmektedir (Nagatomo vd. 2013). Bulgularımız, GATA3'in Cdx2 yıkımından etkilenmediğini açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 4.6). Bu durum CDX2 yoksunluğunda GATA3'in TE kurulumu için telafi edici bir rol oynayabileceğini işaret etmektedir. CDX2-KO embriyoların hala TE'yi oluşturabiliyor olması sığır embriyonik CDX2'nin TE oluşumu için gerekli olmayabileceğini ve blastosist oluşumu için mutlak bir gereklilik olmadığını kanıtı olabilir. Dolayısıyla bu bulgular, farelerin memeli gelişiminin preimplantasyon aşamalarını temsil etmeyebileceğini vurgulamaktadır.

Her iki hücre soyunun da embriyonik ve fetal hayatta kalma için kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Koo vd. 2002, Stojkovic vd. 1998, Van soom vd. 1996). Ancak, sığır embriyolarında ICM'de etkili olan SOX2 ve CDX2 (TE) arasındaki ilişki hala belirsizdir. İlginç bir şekilde, CDX2-KO edilen blastosistlerde SOX2'nin ICM'de sınırlı olduğunu, SOX2 pozitif hücre sayısının değişmediği görülmüştür (Şekil 4.5). ICM oluşumu ve kavitasyon sonrası CDX2-KO edilmiş sığır embriyolarında blastosöl oluşumu meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.3). Bu kapsamda, önceki raporlarda gösterildiği gibi, sığır embriyolarında TE oluşturmak için CDX2'nin vazgeçilebilir olduğunu söylenebilir (Berg vd. 2011; Goissis ve Cibelli, 2014b).

Preimplantasyon gelişim sürecinin düzenlenmesinde bazı önemli farklılıklar bulundurmalarına rağmen bazı bulgular farelerin aksine sığır embriyolarının insan embriyonik gelişiminin anlaşılması için daha iyi bir model olabileceğini göstermektedir (Chen vd. 2009; Wrenzycki, 2018). CDX2, OCT4 gibi transkripsiyon faktörlerinin insan (Chen vd. 2009; Niakan ve Eggan, 2013) ve sığır (Berg vd. 2011) embriyolarında benzer zamansal-mekansal ifade modeline sahip olduklarını, fare embriyolarının ise bu türlere göre önemli farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (Niwa vd., 2005; Strumpf vd., 2005; Niakan ve Eggan, 2013). Sığır preimplantasyon gelişiminde embriyonik OCT4'ün gerekliliği yakın zamanda zigotlara CRISPR/Cas-9'un enjeksiyonu ile KO yaklaşımı kullanılarak aydınlatılmıştır (Daigneault vd. 2018). Bu sonuçlar, CRISPR tarafından

düzenlenmiş insan embriyolarındaki fonksiyonları ile benzer bulunmuştur (Fogarty vd. 2017).

nceki alışmalar ile benzer şekilde, tamamlanan tez çalışmasından elde edilen bulgular farelerden görülen gerekliliğın (Strumpf vd. 2005) aksine CDX2'nin sığır preimplastasyon gelişim süreci için vazgeçilebilir olduğunu ortaya koymuştur. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda fare ve sığırılar arasında büyük farklılıklar olduğu dolayısıyla model organizma olarak kullanılan farelerin aksine sığırılarının memeli preimplantasyon gelişimini daha iyi temsil edebileceği ve insan çalışmaları için alternatif model organizma olarak kullanılabileceği söylenebilir.



6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, memeli embriyoların gelişimi sırasında önemli bir rol oynadığı fareler üzerinde gösterilen CDX2 genini hedefleyen CRISPR bileşenleri tasarlanmış ve *in vitro* olarak mature edilmiş sığır oositlerine başarıyla enjekte edilmiştir. Ardından, bu oositler *in vitro* olarak fertilize edilerek preimplantasyon gelişimin sekizinci gününe kadar kültüre edilmiş, morfolojik olarak incelenmiş ve genetik analizlerle genotiplendirilmiştir. Deney grubu (gRNA+Cas9) ve kontrol grubu (Cas9) arasındaki gelişimsel farklılıklar titizlikle değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, CDX2 genini susturmak amacıyla yapılan bu CRISPR müdahalesinin (bu grupta değişken sayıda KO embriyo olmasına rağmen) blastosist oluşumunu önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. Genotip analizlerinden sonra, normal morfolojiye sahip ve GATA3 adı verilen bir trofektoderm belirteci eksprese edebilen KO blastosistlerin mevcut olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, CDX2'nin sığır preimplantasyon embriyo gelişimindeki trofektoderm hücrelerinin farklılaşması için esasen gereksiz olabileceğini, CDX2-KO farelerinin fenotipine dayanarak elde edilen sonuçlardan farklılık gösterdiğini ortaya çıkartmıştır. Bu sonuca dayanarak, memeliler arasında türlerin ilk soy farklılaşması süreçlerinin büyük çeşitlilik gösterebileceği söylenebilir.

Sığır preimplantasyon gelişiminin genetik temellerinin ve etkileşimlerinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması, terapötik tıp ve tarımsal araştırmalardaki ilerlemeler açısından çeşitli önemli yönler içerir:

Genetik seçim ve ıslah programları: Sığır yetiştiriciliği, et ve süt ürünleri üretimi gibi önemli tarımsal faaliyetlerin temelini oluşturur. Genetik bilgi, sığır popülasyonlarının daha iyi yönetilmesine ve geliştirilmesine katkı sağlar. Sığır preimplantasyon gelişimiyle ilgili genetik araştırmalar, istenen özelliklere sahip sığır ırklarını geliştirmek için kullanılabilecek genetik işaretleyicilerin tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

Gen tedavisi ve kök hücre araştırmaları: Sığır preimplantasyon gelişimi üzerine yapılan araştırmalar, insanlarda önem taşıyan gen tedavisi ve kök hücre çalışmalarına da katkı sağlamaktadır. Bu çalışmalar, hastalıkların tedavisi için genetik müdahalelerin ve hücresel tedavilerin potansiyelini anlamamıza yardımcı olabilir.

Biyomedikal araştırmalar: Sığır preimplantasyon gelişimi, insan embriyolojisi ve gelişimi ile benzerlikler gösterir. Bu nedenle, bu alandaki araştırmalar insanlar için önemli bilgiler sunabilir. İnsan embriyonik gelişimin anlaşılması, üreme, doğum kusurları ve hastalıkların tedavisi üzerinde olumlu etkilere sahip olabilir.

Tarımsal verimlilik ve sürdürülebilirlik: Sığır yetiştiriciliği, dünya genelinde gıda üretimi ve tüketimi açısından hayati bir rol oynar. Sığır preimplantasyon gelişimiyle ilgili genetik çalışmalar, sığırların daha verimli ve hastalıklara dayanıklı hale getirilmesine

yardımcı olabilir. Bu, gıda üretiminin artmasına ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının teşvik edilmesine katkıda bulunabilir.

Etik ve hukuki ihtiyaçlar: Sığır preimplantasyon gelişimi ile ilgili araştırmalar, etik ve hukuki konuları da gündeme getirir. Bu çalışmaların sonuçları, hayvan refahı ve etik standartlar üzerinde etkisi olabilir. Bu nedenle, bu araştırmaların sonuçlarının dikkatle yönetilmesi ve düzenlenmesi önemlidir.

Sonuç olarak, sığır preimplantasyon gelişiminin genetik ve moleküler temellerinin anlaşılması, tarımsal üretim, tıp ve biyoteknoloji alanlarında bir dizi önemli uygulama ve ilerleme potansiyeli sunar. Bu çalışmalar, daha sağlıklı ve verimli bir tarım endüstrisi oluşturmak ve insanların sağlık sorunlarını daha iyi anlamak ve tedavi etmek için büyük bir öneme sahiptir. Aynı zamanda, preimplantasyon döneminde yer alan hücre soylarının meydana gelmesindeki faktörlerin belirlenmesi ve sığır trofektoderm (TE) oluşum mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılması, yardımcı üreme yöntemlerinin kullanımının artmasına ve *in vitro* fertilizasyon ve somatik hücre nükleer transfer embriyolarından kaynaklanan sorunların çözümüne katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Anonim 2021a. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü. <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/kirmizi%20et%20spb.pdf> Son Erişim Tarihi 14 Ağustos 2023
- Anonim 2021b. International Embryo Technology Society. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/News/December_2021.pdf Son Erişim Tarihi: 11 Eylül 2023.
- Anonim 2022. The Food and Agriculture Organization. <https://www.fao.org/3/CC0308EN/Dairy.pdf> Son Erişim Tarihi: 5 Ekim 2023.
- Anonim 2023. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu. “Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi”. https://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/Vizyon2023_Strateji_Belgesi.pdf Son erişim tarihi: 14 Haziran 2023.
- Arat, S. Caputcu, A.T. Cevik, M. Akkoc, T. Cetinkaya, G. and Bagis, H. 2016. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells of cloned bovine embryos. *Zygote*, 24 (4): 554-562.
- Avilion, A.A. Nicolis, S.K. Pevny, L.H. Perez, L. Vivian, N. and Lovell-Badge, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*, 17 (1): 126-140.
- Anwar, A. and Moussa, M.D. 2002. In vitro maturation of oocytes. OBGYN.net Advertisement. Jan:
- Akizawa, H. Kobayashi, K. Bai, H. Takahashi, M. Kagawa, S. Nagatomo, H. and Kawahara, M. 2018. Reciprocal regulation of TEAD4 and CCN2 for the trophoctoderm development of the bovine blastocyst. *Reproduction*, 155 (6): 563-571.
- Akyol, N. 2005. Sığırlarda İn Vivo ve İn Vitro Fertilizasyon (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45 (2): 53-61.
- Akyol, N. 2006. Sığırlarda in vitro oosit maturasyonu. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 46 (1): 59-69.
- Akyol, N. Kızıl, S.H. and Karaşahin, T. 2007. İn Vitro Sığır Embriyosu Üretim ve Transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47 (1): 1-8.
- Akyol, N. 2008. İn vitro sığır embriyosu üretimi. Embriyo Transferi (Bülten). 17 Aralık 2008.
- Arav, A. 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*, 55 (7): 1561-1565.

- Arnold, S.J. and Robertson, E.J. 2009. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (2): 91–103.
- Barrangou, R. Fremaux, C. Deveau, H. Richards, M. Boyaval, P. Moineau, S. and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819):1709-1712.
- Bavister, B.D. Rose-Hellekant, T.A., and Pinyopummintr, T. 1992. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37 (1): 127-146.
- Bavister, B.D. 2002. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*, 124(2):181–196.
- Beck, F. Erler, T. Russell, A. and James, R. 1995. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Developmental Dynamics*, 204 (3): 219-227.
- Blakeley, P. Fogarty, N.M. Del Valle, I. Wamaita, S.E. Hu, T.X. Elder, K. Snell, P. Christie, L. Robson, P. and Niakan, K.K. 2015. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development*, 142 (18): 3151-3165.
- Bell, C.E. Calder, M.D. and Watson, A.J. 2008. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Molecular Human Reproduction*, 14 (12): 691–701.
- Berg, D.K. Smith, C.S. Pearton, D.J. Wells, D.N. Broadhurst, R. Donnison, M. and Pfeffer, P.L. 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Developmental cell*, 20 (2): 244-255.
- Bermejo-Álvarez, P. Rizos, D. Rath, D. Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A. 2008. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X-or Y-sorted sperm differentially? *Biology of Reproduction*, 79 (4): 594-597.
- Betteridge, K.J. and Fléchon, J.E. 1988. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 29 (1):155-187.
- Betteridge, K.J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal reproduction science*, 79 (3-4):203-244.
- Birler, S. 1997. Sığır oositlerinde morfolojik görünümün in vitro olgunlaştırma ve fertilizasyon üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23 (2):345-352.
- Birler, S. Pabuçcuoğlu, S. İleri, İ.K. Alkan, S. ve Evecen, M. 1998. Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 22, 551-557.

- Birler, S. Pabuccuoğlu, S. Atalla, H. Alkan, S. Özdaş, Ö.B. Bacınoğlu, S. ve İleri, İ.K. 2002. İn vitro üretilen koyun embriyolarının transferi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26 (6): 1421-1426.
- Boni, R. Cuomo, A. and Tosti, E. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, 66 (3): 836-842
- Bou, G. Liu, S. Sun, M. Zhu, J. Xue, B. Guo, J. Zhao, Y. Qu, B. Weng, X. Wei, Y. et al. 2017. CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts. *Development*, 144 (7): 1296-1306.
- Brackett, B.G. and Bousquet, D. 1984. Comparative aspects of fertilization in vitro. *Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Churchill Livingstone, London, 32-43.
- Brackett, B.G. Younis, A.I. and Fayrer-Hosken, R.A. 1989. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and sterility*, 52 (2): 319-324.
- Bishop, T.F. and Van Eenennaam, A.L. 2020. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *Journal of Experimental Biology*, 223(Suppl_1), jeb207159.
- Bucak, N.M. Satilmis, M. Kizil, H.S. Karasahin, T. and Akyol, N. 2010. Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (1): 69-74.
- Calarco, P.G. and Brown, E.H. 1969. An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *Journal of Experimental Zoology*, 171 (3): 253-283.
- Camargo, L.S.D.A. Viana, J.H.M. De Sá, W.F. Ferreira, A.D.M. Ramos, A.D.A. and Vale Filho, V.R. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, v. 3, n. 1, p. 19-28.
- Carlson, D.F. Tan, W. Lillico, S.G. Stverakova, D. Proudfoot, C. Christian, M. Voytas, D.F. Long, C.R. Whitelaw C.B.A. and Fahrenkrug, S.C. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (43): 17382-17387.
- Cauffman, G. Van de Velde, H. Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. 2004. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular human reproduction*, 11 (3): 173-181.
- Centola, G.M. Herko, R. Andolina, E. and Weisensel, S. 1998. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertility and sterility*, 70 (6): 1173-1175.

- Cetica, P.D. Dalvit, G.C. and Beconi, M.T. 1999. Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23 (2): 125-133.
- Chawengsaksophak, K. de Graaff, W. Rossant, J. Deschamps, J. and Beck, F. 2004. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (20): 7641-7645.
- Chen, A.E. Egli, D. Niakan, K. Deng, J. Akutsu, H. Yamaki, M. Cowan, C. Fitz-Gerald, C. Zhang, K. Melton, D.A. et al. 2009. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell stem cell*, 4 (2): 103-106.
- Chen, L. Wang, D. Wu, Z. Ma, L. and Daley, G.Q. 2010. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell research*, 20 (9): 982-993.
- Ciornei, Ş. G. 2021. Embryo Transfer. In Animal Reproduction. IntechOpen.
- Crosier, A.E. Farin, P.W. Dykstra, M.J. Alexander, J.E. and Farin, C.E. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of reproduction*, 64 (5): 1375-1385.
- Ciornei, S. 2021. Embryo Transfer [Online First]. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99683>.
- Çıldır, Ö.Ş. and Özmen, Ö. 2018. Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32 (3): 559-566.
- Daigneault, B.W. Rajput, S. Smith, G.W. and Ross, P.J. 2018. Embryonic POU5F1 is required for expanded bovine blastocyst formation. *Scientific reports*, 8(1): 7753.
- Deltcheva, E. Chylinski, K. Sharma, C.M. Gonzales, K. Chao, Y. Pirzada, Z.A. Eckert, M.R. Vogel, J. and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471 (7340): 602-607.
- Denicol, A.C. Block, J. Kelley, D.E. Pohler, K.G. Dobbs, K.B. Mortensen, C.J. Ortega, M.S. and Hansen, P.J. 2014. The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. *The FASEB Journal*, 28 (9): 3975-3986.
- Dresser, B.L. 1988. Cryobiology, embryo transfer, and artificial insemination in ex situ animal conservation programs. In Biodiversity (pp. 296-308). Washington, DC: National Academy of Sciences Press.
- Driver, A.M. Huang, W. Kropp, J. Peñagaricano, F. and Khatib, H. 2013. Knockdown of CDKN1C (p57kip2) and PHLDA2 results in developmental changes in bovine pre-implantation embryos. *PloS one*, 8 (7): e69490.

- Ducibella, T. Albertini, D.F. Anderson, E. and Biggers, J.D. 1975. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Developmental biology*, 45 (2): 231-250.
- Ducibella, T. Ukena, T. Karnovsky, M. and Anderson, E. 1977. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *The Journal of cell biology*, 74 (1): 153-167.
- Eckert, J.J. and Fleming, T.P. 2008. Tight junction biogenesis during early development. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778 (3): 717–728.
- Fair, T. 2010. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 22 (1): 13-20.
- Farin, P.W. Piedrahita, J.A. and Farin, C.E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65 (1): 178-191.
- Feldman, B. Poueymirou, W. Papaioannou, V.E. DeChiara, T.M. and Goldfarb, M. 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, 267 (5195): 246-249.
- Fleming, T.P. and Pickering, S.J. 1985. Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 89 (1): 175–208.
- Fleming, T.P. 1987. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Developmental Biology*, 119 (2): 520–531.
- Fogarty, N.M. McCarthy, A. Snijders, K.E. Powell, B.E. Kubikova, N. Blakeley, P. Lea, R. Elder, K. Wamaitha, S.E. Kim, D. et al. 2017. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550 (7674): 67-73.
- Galli, C. Duchi, R. Colleoni, S. Lagutina, I. and Lazzari, G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, 81 (1): 138-151.
- Gaj, T. Gersbach, C.A. and Barbas III, C.F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31 (7): 397-405.
- Gengler, N. and Druet, T. 2001. Impact of biotechnology on animal breeding and genetic progress. In *Biotechnology in Animal Husbandry* (pp. 33-45). Springer, Dordrecht.
- Gerri, C. McCarthy, A. Alanis-Lobato, G. Demtschenko, A. Bruneau, A. Loubersac, S. Fogarty, N.M.E., Hampshire, D. Elder, K. et al. 2020. Initiation of a conserved trophectoderm program in human, cow and mouse embryos. *Nature*, 587 (7834): 443-447.

- Geurts, A.M. Cost, G.J. Freyvert, Y. Zeitler, B. Miller, J.C. Choi, V.M., Jenkins, S.S. Wood, A. Cui, X. Meng, X. et al. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 325 (5939): 433-433.
- Goissis, M. D., & Cibelli, J. B. 2014a. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 90 (2): 30-1.
- Goissis, M.D. and Cibelli, J.B. 2014b. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 81 (10): 962-970.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. University Press, 30-142.
- Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos (Vol. 27). Cabi. International, Wallingford, 672 pp.
- Gordon, I. (Ed.). (2017). Reproductive technologies in farm animals. 2nd Edition. University College Dublin.
- Graf, A. Krebs, S. Zakhartchenko, V. Schwalb, B. Blum, H. and Wolf, E. 2014. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (11): 4139-4144.
- Grabarek, J. B. Plusa, B. Glover, D.M. and Zernicka-Goetz, M. 2002. Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis*, 32 (4): 269-276.
- Grøndahl, C. 2008. Oocyte maturation. *Dan Med Bull*, 55, 1-16.
- Gündoğan, M. 1998. İneklerde İn vitro Fertilizasyon (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 38 (2): 103-115.
- Hackett, P.B. Fahrenkrug, S.C. and Carlson, D.F. 2014. The promises and challenges of precision gene editing in animals of agricultural importance. *North American Agricultural Biotechnology Council Report*, 26: 39-45.
- Hansen, P.J. 2014. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. In *Current and future reproductive technologies and world food production* (pp. 1-22). Springer, New York, NY.
- Hasler JF, Jennifer P, Barfield, 2017. In Vitro Fertilization Bioniche Animal Health. Department of Biomedical Sciences, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.
- Hawk, H.W. and Wall, R.J. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41 (8): 1571-1583.

- Hendriksen, P.J.M., Vos, P.L.A.M. Steenweg, W.N.M. Bevers, M.M. and Dieleman, S.J. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, 53 (1): 11-20.
- Hoekstra, A.Y. and Wiedmann, T.O. 2014. Humanity's unsustainable environmental footprint. *Science*, 344 (6188): 1114-1117.
- Home, P. Ray, S. Dutta, D. Bronshteyn, I. Larson, M. and Paul, S. 2009. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (42): 28729-28737.
- Hsu, P.D. Lander, E.S. and Zhang, F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157 (6): 1262-1278.
- Iritani, A. and Niwa, K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Reproduction*, 50 (1): 119-121.
- Jinek, M. Chylinski, K. Fonfara, I. Hauer, M. Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096): 816-821.
- Kanagawa, H. Shimohira, I. and Saitoh, N. 1995. Manual of bovine embryo transfer. National Livestock Breeding Center MAFF, JICA-Japan, 1, 34.
- Kang, M. Piliszek, A. Artus, J. and Hadjantonakis, A.K. 2013. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development*, 140 (2): 267-279.
- Kaniyamattam, K. Block, J. Hansen, P.J. and De Vries, A. 2017. Comparison between an exclusive in vitro-produced embryo transfer system and artificial insemination for genetic, technical, and financial herd performance. *Journal of dairy science*, 100 (7): 5729-5745.
- Kątska, L. and Smorąg, Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Animal Reproduction Science*, 7 (5): 451-460.
- Kawamoto, T. Pontelo, T. Faria, O. Fidelis, A. Dode, M. Viana J. and Figueiredo, R. 2019. OPU and IVEP from non-stimulated 2-4 and 8-10 months old Nelore (*Bos taurus indicus*) donors. *Animal Reproduction*, 16 (3): 597.
- Kılıçoğlu, Ç. 1985. The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32 (02): 301-310.
- Kirchhof, N. Carnwath, J.W. Lemme, E. Anastassiadis, K. Scholer, H. and Niemann, H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of reproduction*, 63 (6): 1698-1705.

- Koo, D.B. Kang, Y.K. Choi, Y.H. Park, J.S. Kim, H.N. Oh, K.B. Son, D.S. Park, H. Lee, K.K. and Han, Y.M. 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of reproduction*, 67 (2): 487-492.
- Krisher, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, 82 (suppl_13): E14-E23.
- Kong, Q. Yang, X. Zhang, H. Liu, S. Zhao, J. Zhang, J. Weng, X. Jin, J. and Liu, Z. 2020. Lineage specification and pluripotency revealed by transcriptome analysis from oocyte to blastocyst in pig. *The FASEB Journal*, 34 (1): 691-705.
- Kuijk, E.W. Du Puy, L. Van Tol, H.T. Oei, C.H. Haagsman, H.P. Colenbrander, B. and Roelen, B.A. 2008. Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics*, 237 (4): 918-927.
- Kuijk, E.W. Van Tol, L.T. Van de Velde, H. Wubbolts, R. Welling, M. Geijssen, N. and Roelen, B.A. 2012. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development*, 139 (5): 871-882.
- Lamas-Toranzo, I. Ramos-Ibeas, P. Pericuesta, E. and Bermejo-Álvarez, P. 2018. Directions and applications of CRISPR technology in livestock research. *Animal Reproduction*, 15(3), 292.
- Lamas-Toranzo, I. Galiano-Cogolludo, B. Cornudella-Ardiaca, F. Cobos-Figueroa, J. Ousinde, O. and Bermejo-Álvarez, P. 2019. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome editing in bovine embryos. *Scientific reports*, 9 (1): 14900.
- Lamas Toranzo, I. 2021. Development and application of CRISPR technology for the study of reproductive processes in mammals, PhD Thesis, Madrid, İspanya.
- Laible, G. 2018. Production of transgenic livestock: overview of transgenic technologies. *Animal Biotechnology* 2, 95-121.
- Levy, J.B. Johnson, M.H. Goodall, H. and Maro, B. 1986. The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 95 (1): 213–237.
- Lin, J.C. and Van Eenennaam, A.L. 2021. Electroporation-mediated genome editing of livestock zygotes. *Frontiers in genetics*, 12:546.
- Liu, J.M. Jin, Z.Q. Zhao, X.X. and Zhu, Y.D. 1991. The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. *Veterinary research communications*, 15 (4): 257-260.

- Liu, X. Huang, J. Chen, T. Wang, Y. Xin, S. Li, J. Pei, G. and Kang, J. 2008. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell research*, 18 (12): 1177-1189.
- Llobat, L. 2021. Pluripotency and Growth Factors in Early Embryonic Development of Mammals: A Comparative Approach. *Veterinary Sciences*, 8 (5): 78.
- Lonergan, P. Rizos, D. Kanka, J. Nemcova, L. Mbaye, A.M. Kingston, M. Wade, M. Duffy, P. and Boland, M.P. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126 (3): 337-346.
- Lonergan, P. Fair, T. Corcoran, D. and Evans, A.C.O. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65 (1): 137-152.
- Lonergan, P. and Fair, T. 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 255-268.
- Madison, V. Avery, B. and Greve, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Animal Reproduction Science*, 27 (1): 1-11.
- Maeder, M.L. and Gersbach, C.A. 2016. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24 (3): 430-446.
- Mali, P. Yang, L. Esvelt, K.M. Aach, J. Guell, M. DiCarlo, J.E. Norville, J.E. and Church, G.M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121): 823-826.
- Mapletoft, R.J. 1985. Embryo transfer in the cow: General procedures. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)*.
- Mapletoft, R.J. and Hasler, J.F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Revue scientifique et technique-International Office of Epizootics*, 24 (1): 393-403
- Meissner, A. and Jaenisch, R. 2006. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature*, 439 (7073): 212-215.
- Mendes, J.O.B. Burns, P.D. De La Torre-Sanchez, J.F. Seidel, G.E. 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, 60 (2): 331-340.
- Mir, T.U.G. Wani, A.K. Akhtar, N. Shukla, S. 2022. CRISPR/Cas9: Regulations and challenges for law enforcement to combat its dualuse. *Forensic science international*, 334:111274.
- Mitsui, K. Tokuzawa, Y. Itoh, H. Segawa, K. Murakami, M. Takahashi, K. Maruyama, M. Maeda, M. and Yamanaka, S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for

- maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113 (5): 631-642.
- Modzelewski, A.J. Chen, S. Willis, B.J. Lloyd, K.K. Wood, J.A. and He, L. 2018. Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nature protocols*, 13 (6): 1253-1274.
- Mojica, F.J. Díez-Villaseñor, C. García-Martínez, J. and Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60 (2): 174-182.
- Moore, J.K. and Haber, J.E. 1996. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 16 (5): 2164-2173.
- Morris, S.A. and Zernicka-Goetz, M. 2012. Formation of distinct cell types in the mouse blastocyst. In *Mouse Development*, pp 203–217. Ed JZ Kubiak. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nagatomo, H. Kagawa, S. Kishi, Y. Takuma, T. Sada, A. Yamanaka, K. I., Abe, Y. Wada, Y. Takahashi, M. Kono, T. et al. 2013. Transcriptional wiring for establishing cell lineage specification at the blastocyst stage in cattle. *Biology of reproduction*, 88 (6): 158-1.
- Negrón-Pérez, V.M. Zhang, Y. and Hansen, P.J. 2017. Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. *Reproduction*, 154 (5): 627-644.
- Niakan, K.K. and Eggan, K. 2013. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental biology*, 375 (1): 54-64
- Nichols, J. Zevnik, B. Anastassiadis, K. Niwa, H. Klewe-Nebenius, D. Chambers, I. Schöler, H. and Smith, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95 (3): 379-391.
- Niemann, H. Carnwath, J.W. Herrmann, D. Wiczorek, G. Lemme, E. Lucas-Hahn, A. and Olek, S. 2010. DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 12 (1): 33-42.
- Niemann, H. and Wrenzycki, C. (Eds.). 2018. *Animal Biotechnology*. Springer.
- Nikas, G. Ao, A. Winston, R.M. and Handyside, A.H. 1996. Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biology of reproduction*, 55 (1): 32-37.
- Nishioka, N. Yamamoto, S. Kiyonari, H. Sato, H. Sawada, A. Ota, M. Nakao, K. and Sasaki, H. 2008. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mechanisms of development*, 125 (3-4): 270-283.

- Niwa, H. Toyooka, Y. Shimosato, D. Strumpf, D. Takahashi, K. Yagi, R. and Rossant, J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123 (5): 917-929.
- Pedersen, R.A. Wu, K. and BaŁakier, H. 1986. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Developmental biology*, 117(2), 581-595.
- Pérez-Gómez, A. González-Brusi, L. Bermejo-Álvarez, P. and Ramos-Ibeas, P. 2021. Lineage differentiation markers as a proxy for embryo viability in farm ungulates. *Frontiers in veterinary science*, 8: 680539.
- Petersen, B. 2018. DNA Nucleases and their Use in Livestock Production. In *Animal Biotechnology 2* (pp. 123-148). Springer, Cham.
- Pickles, A.C. 1987. Current therapy in theriogenology, 2nd edn, edited by David A. Morrow, published by WB Saunders Co, Philadelphia.
- Piliszek, A. Grabarek, J.B. Frankenberg, S.R. and Plusa, B. 2016. Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 22 (10): 681-690.
- Qamar, A.Y. Khan, A.U. Jamil, A. and Abubakar, M. 2015. Biotechnology and animal reproduction. In *The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock* (pp. 1-26). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ralston, A. and Rossant, J. 2005. Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clinical genetics*, 68 (2): 106-112.
- Ralston, A. and Rossant, J. 2008. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Developmental biology*, 313 (2): 614-629.
- Ralston, A. Cox, B.J. Nishioka, N. Sasaki, H. Chea, E. Rugg-Gunn, P. Guo, G. Robson, P. Draper, J.S. and Rossant, J. 2010. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development*, 137 (3): 395-403.
- Ramos-Ibeas, P. Sang, F. Zhu, Q. Tang, W.W. Withey, S. Klisch, D. Wood, L. Loose, M. Surani, M.A. and Alberio, R. 2019a. Pluripotency and X chromosome dynamics revealed in pig pre-gastrulating embryos by single cell analysis. *Nature communications*, 10 (1): 500.
- Ramos-Ibeas, P. Heras, S. Gómez-Redondo, I. Planells, B. Fernández-González, R. Pericuesta, E. Lagune-Barraza, R. Pérez-Cerezales, S. and Gutiérrez-Adán, A. 2019b. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Molecular reproduction and development*, 86 (10): 1292-1306.
- Rizos, D. Ward, F. Duffy, P.A.T. Boland, M.P. and Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro

versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, 61 (2): 234-248.

Sakurai, N. Takahashi, K. Emura, N. Fujii, T. Hirayama, H. Kageyama, S. Hashizume, S. Sawai, K. 2016. The necessity of OCT-4 and CDX2 for early development and gene expression involved in differentiation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 18 (5): 309-318.

Sakurai, N. Takahashi, K. Emura, N. Hashizume, T. and Sawai, K. 2017. Effects of downregulating TEAD4 transcripts by RNA interference on early development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 63 (2): 135-142.

Samardzija, M. Karadjole, M. Matkovic, M. Cergolj, M. Getz, I. Dobranic, T. Tomaskovic, A. Petric, J. Surina, J. Grizelj, J. et al. 2006. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal reproduction science*, 91 (3-4): 237-247.

Sander, J.D. and Joung, J.K. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32 (4): 347-355.

Sartori, R. Bastos, M.R. and Wiltbank, M.C. 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single-and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 22 (1): 151-158.

Sasaki, H. 2010. Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Development, growth and differentiation*, 52 (3): 263-273.

Sawai, K. 2021. Roles of cell differentiation factors in preimplantation development of domestic animals. *Journal of Reproduction and Development*, 67 (3): 161-165.

Schier, A.F. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*, 316 (5823): 406-407.

Schrode, N. Saiz, N. Di Talia, S. and Hadjantonakis, A.K. 2014. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Developmental cell*, 29 (4): 454-467.

Seidel Jr, G.E. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211 (4480): 351-358.

Seidel, G.E. and Seidel, S.M. 1981. The embryo transfer industry. In Brackett, B.G., Seidel, G.E., Jr. & Seidel, S.M., eds. *New technologies in animal breeding*, p. 41–80. Orlando, FL, Academic Press.

Sela-Abramovich, S. Edry, I. Galiani, D. Nevo, N. and Dekel, N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, 147 (5): 2280–2286.

- Selk, G. 2002. Embryo transfer in cattle. Oklahoma Cooperative Extension Service.
- Seruggia, D. and Montoliu, L. 2014. The new CRISPR–Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic research*, 23 (5): 707-716.
- Sethi, M. Shah, N. Kumar, P. Bhatia, N. Rohilla, A. and Mohanty, T.K. 2021. Embryo Transfer Technology: Non-Surgical Collection, Evaluation and Transfer of the Embryo in Cow. In: Dr. S Sreedhar and Dr. S. Bindumadhuri (Ed.), *Current Research in Animal Husbandry and Veterinary Sciences (Volume-2)*. Integrated publications, Delhi, pp.83-105.
- Shen, B. Zhang, J. Wu, H. Wang, J. Ma, K. Li, Z. Zhang, X. Zhang, P. Huang, X. 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell research*, 23 (5): 720-723.
- Shioya, Y. Kuwayama, M. Fukushima, M. Iwasaki, S. And Hanada, H. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, 30 (3): 489-496.
- Simmet, K. Zakhartchenko, V. Philippou-Massier, J. Blum, H. Klymiuk, N. and Wolf, E. 2018. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (11): 2770-2775.
- Stamatiadis, P. Boel, A. Cosemans, G. Popovic, M. Bekaert, B. Guggilla, R. Tang, M. Sutter, P.D. Nieuwerburgh, F.V. Menten, B. et al. 2021. Comparative analysis of mouse and human preimplantation development following POU5F1 CRISPR/Cas9 targeting reveals interspecies differences. *Human Reproduction*, 36 (5): 1242-1252.
- Stojkovic, M. Büttner, M. Zakhartchenko, V. Brem, G. and Wolf, E. 1998. A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Animal reproduction science*, 50 (1-2): 1-9.
- Strumpf, D. Mao, C.A. Yamanaka, Y. Ralston, A. Chawengsaksophak, K. Beck, F. and Rossant, J. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, 132 (9):2093-102.
- Suwińska, A. Czołowska, R. Ożdżeński, W. and Tarkowski, A.K. 2008. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Developmental biology*, 322 (1): 133-144.
- Takashi, M. 1998. In vitro growth and development of bovine oocytes. Symposium on molecular bioengineering of food animals. 23-24 October, Tokyo, Japan.

- Takemoto, T. (2020). Zygote electroporation for CRISPR/Cas9 delivery to generate genetically modified mice. *Electroporation Protocols: Microorganism, Mammalian System, and Nanodevice*, 121-126.
- Tekeli, T. 1984. Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 31: 186-196.
- Tekeli, T. Güler, M. Aksoy, M. 1990. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *SÜ Vet Fak Derg*, 6 (1): 13-5.
- Tekeli, T. 1992. The effect of EDTA on the development of mouse eggs fertilized in vitro. *SÜ Vet Fak Derg*, 8 (1): 25-7.
- Tesson, L. Usal, C. Ménoret, S. Leung, E. Niles, B.J. Remy, S. Santiago, Y. Vincent, A.I. Meng, X. Zhang, L. et al. 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature biotechnology*, 29 (8): 695-696.
- Thomasen, J.R. Willam, A. Egger-Danner, C. and Sørensen, A.C. 2016. Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs. *Journal of dairy science*, 99 (2): 1331-1340.
- Tschaharganeh, D.F. Lowe, S.W. Garippa, R.J. and Livshits, G. 2016. Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. *The FEBS journal*, 283 (17): 3194-3203.
- Van Soom, A. Boerjan, M. Ysebaert, M.T. and de Kruif, A. 1996. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 45 (2): 171-182.
- Vince, G. 2014. *Adventures in the Anthropocene: A journey to the heart of the planet we made*. Random House.
- Wang, Y.S. Tang, S. An, Z.X. Li, W.Z. Liu, J. Quan, F.S. Hua, S. and Zhang, Y. 2011. Effect of mSOF and G1. 1/G2. 2 media on the developmental competence of SCNT-derived bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 46 (3): 404-409.
- Wang, H. Yang, H. Shivalila, C.S. Dawlaty, M.M. Cheng, A.W. Zhang, F. and Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153 (4): 910-918.
- Watson, A.J. and Barcroft, L.C. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 6: 708-730.
- Wegner, M. 2010. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42 (3): 381-390.

- Wei, Q. Zhong, L. Zhang, S. Mu, H. Xiang, J. Yue, L. Dai, Y. and Han, J. 2017. Bovine lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Biology of Reproduction*, 97(1): 5-17.
- Wei, J. Gaynor, P. Cole, S. Brophy, B. Oback, B. and Laible, G. 2018. Developing the laboratory conditions for bovine zygote-mediated genome editing by electroporation. In *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (Vol. 111118).
- Whyte, J.J. Zhao, J. Wells, K.D. Samuel, M.S. Whitworth, K.M. Walters, E.M. Laughlin, M.H. Prather, R.S. 2011. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Molecular reproduction and development*, 78 (1): 2.
- Wicklow, E. Blij, S. Frum, T. Hirate, Y. Lang, R.A. Sasaki, H. and Ralston, A. 2014. HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS genetics*, 10 (10): e1004618.
- Wilson, T.E. and Lieber, M.R. 1999. Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining: evidence for a DNA polymerase β (POL4)-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (33): 23599-23609.
- Wiltbank, M.C. Baez, G.M. Garcia-Guerra, A. Toledo, M.Z. Monteiro, P.L. Melo, L.F. Ochoa, J.C. Santos, J.E.P. and Sartori, R. 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86 (1): 239-253.
- Wrenzycki, C. Herrmann, D. and Niemann, H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68, S77-S83.
- Wrenzycki, C. 2018. Gene expression analysis and *in vitro* production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 14-19.
- Wu, G. and Schöler, H.R. 2014. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*, 3 (1): 1-10.
- Yagi, R. Kohn, M.J. Karavanova, I. Kaneko, K.J. Vullhorst, D. DePamphilis, M.L. and Buonanno, A. 2007. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development*, 134 (21): 3827-36.
- You, Y. Ramachandra, S.G. and Jin, T. 2020. A CRISPR-based method for testing the essentiality of a gene. *Scientific Reports*, 10 (1): 14779.
- Zhang, M. Lu, K.H. and Seidel Jr, G.E. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, 60(9): 1657-1663.

- Zhang, K. and Smith, G.W. 2015. Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 27 (6): 880-896.
- Zavos, P.M. 1992. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim-up method. *Fertility and sterility*, 57 (6): 1326-1330.



8. EKLER

EK-1. Yurtdışı proje yürütücüsünden alınan yazı.



Madrid, July 29th 2023

To whom it may concern,

I am writing this document to inform that I grant permit to Emel Tüten SevİM to use the data regarding CDX2 KO experiments in the bovine model on her PhD dissertation. Please, do not hesitate to contact me if you need further information.

Sincerely,

Pablo Bermejo-Álvarez
Senior Scientist
Animal Reproduction Department, INIA, CSIC
Avda. Puerta de Hierro 18
28040 Madrid, Spain
Tel: +34 913474047
bermejo.pablo@inia.csic.es

ÖZGEÇMİŞ

Emel TÜTEN SEVİM

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2017-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2014-2016	Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ
Lisans 2009-2014	Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2019-	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Misafir Araştırmacı 2021-2022	The Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) Animal Reproduction, Animal Genomic Engineering, Madrid/İSPANYA
Stajyer (Erasmus+) 2019-2019	The Ministry of Food and Agriculture/Federal Research Institute for Animal Health Friedrich Loeffler Institution-Institute of Farm Animal Genetics (FLI), Hannover/ALMANYA

TEZLER

Doktora: CRISPR/Cas9 Kullanılarak Sığır Preimplantasyon Embriolarının Trofektoderm Farklılaşmasında CDX2 Rolünün Araştırılması.

(Akdeniz Üniversitesi, Antalya. Department of Animal Reproduction, INIA, Madrid/SPAIN)

Danışman: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ
Pablo BERMEJO-ÁLVAREZ (DVM, PhD)

Yüksek Lisans: Nükleer Transfer ile Elde Edilen Klon Sığır ve Yavrularının mtDNA ve Mikrosatellit Belirteçlerle Karakterizasyonu.

(Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ. 2016)

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

Lisans: Sığır Kıkırdak Hücrelerinin Dondurulmasında DMSO'nun Laktatlı Ringer, PBS, (%10) Dekstroz ve Dekstran 40 Çözeltileri ile Kullanılmasının Canlılık Üzerine Etkisi.

(Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ. 2014)

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

BURS VE DESTEKLER

'ERASMUS Staj Hareketliliği', **Stajyer**, 2023 (2 ay). The Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), Animal Reproduction, Animal Genomic Engineering, Madrid/SPAIN.

'TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı', **Bursiyer**, 2021-2022 (12 ay). The Spanish National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), Animal Reproduction, Animal Genomic Engineering, Madrid/SPAIN.

'TÜBİTAK-TOVAG-Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu', **Gözetimci Panelist**, 23.09.2020. Gıda Enkapsülasyon Paneli.

'TÜBİTAK 1001', **Bursiyer**, 2016 (5 ay). Türkiye Eşek (Equus Asinus) Populasyonlarının Morfolojik ve Genetik Karakterizasyonu. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ/TÜRKİYE.

'ERASMUS Staj Hareketliliği', **Stajyer**, 2013 (3 ay). University of Technology and Life Sciences (UTP) Bydgoszcz, POLAND.

'ERASMUS Öğrenim Hareketliliği', **Öğrenci**, 2011-2012 (6 ay). University of Technology and Life Sciences (UTP) Bydgoszcz, POLAND.

PROJELER

Yerli İспенç Tavuğunda Genetik Polimorfizmin SSR Markerler ile Belirlenmesi. **Yardımcı Araştırmacı**, (Akdeniz Üniversitesi BAP) **2019-2021**.

Antalya Habitatında Bulunan *Bombus terrestris dalmatinus* Arılarında Sıcak Şok Proteinleri (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) Bakımından Genetik Potansiyelinin Araştırılması. **Yardımcı Araştırmacı**, (Akdeniz Üniversitesi BAP) **2019-2021**.

Afyonkarahisar Yöresi Ticari Yumurtacı Tavuk İşletmelerinde ALV Hastalığının ve Tümör Baskılayıcı Gen Metilasyonlarıyla İlişkisinin Araştırılması. **Yardımcı Araştırmacı**, (Akdeniz Üniversitesi BAP) **2018-2020**.

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Yıldız, B. İ., **Tütün Sevim, E.**, Aydın, S., Aslan, Y. K., Çetin, R., Erdem, S. U. R., & Karabağ, K. (2023). A study of whether the genetic variation decreased or not in the protected Caucasian bee, *Apis mellifera caucasica* Pollmann, 1889 (Hymenoptera: Apidae) population in isolated regions. *Turkish Journal of Entomology*, 47(3), 271-282.

Pérez-Gómez A., Lamas-Toranzo I., Galiano-Cogolludo, B., Gabriela Hamze J., **Tütün Sevim E.**, Ramos-Ibeas P., Bermejo-Álvarez, P. (2023). 081 HH3 embryos arrest their development prior to maternal recognition of pregnancy. *Animal-science proceedings*, 14(3), 481-482.

Pérez-Gómez A., Álvarez-Sala M., Inglés-Pedreño Á., Lamas-Toranzo I., Galiano-Cogolludo, B., Gabriela Hamze J., **Tütün Sevim E.**, Ramos-Ibeas P., Bermejo-Álvarez, P. (2022). Uncovering the Developmental Defects Associated to HH3 Haplotype by CRISPR Technology. *Reproduction, Fertility and Development*, 35, 208-208.

Galiano-Cogolludo, B., Gabriela Hamze J., Lamas-Toranzo I., Pérez-Gómez A., González-Brusi L., **Tütün Sevim E.**, Ramos-Ibeas P., Bermejo-Álvarez, P. (2022). Bovine Embryos Lacking Progesterone Receptor (PGR) Develop Normally Through Early Elongation. *Animal Reproduction (AR)*, 19(2), 0-0.

Karabağ, K., **Tütün Sevim, E.**, & Taşbaş, Ş. (2021). Genetic Relationships Between Commercially Produced and Natural Populations of in Terms of Mitochondrial COI and CytB. *Journal of Apicultural Science*, 65(2), 315-330.

Tütün Sevim, E., Arat, S. (2021). Combining Dimethyl Sulphoxide (DMSO) with Different Cryoprotectants Ensures Better Cartilage Cell Cryopreservation. *Cryoletters*, 42(4), 220-226.

Karabağ, K., Tunca, R. İ., **Tütün Sevim, E.**, & Doğaroğlu, T. (2020). Current genetic status of honey bees in Anatolia in terms of thirty polymorphic microsatellite markers. *Turkish Journal of Entomology*, 44(3), 333-346.

Tüten Sevim, E., Karabağ, K. (2019). Some Software's Used in DNA Sequencing Based Haplotype Analysis. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp1), 107-109.

Karabağ, K., **Tüten Sevim, E.,** Karşı, T., & Alkan, S. (2019). Comparison of Some Carcass Components of Selected Japanese Quail Lines in terms of SNP Haplotypes. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp3), 68-71.

Tüten Sevim E., Arat S. (2018). Different Methods in mtDNA Analysis of Cloned Animals and Comparison of Their Results. *Academia Journal of Engineering and Applied Sciences*, ICAE Special Issue 2018: 121-127.

Tüten Sevim E., Karabağ K. (2018). Softwares for Phylogenetic Analysis in Animal Biotechnology. *Academia Journal of Engineering and Applied Sciences*, ICAE Special Issue, 2018: 128-134.

Tüten Sevim, E., Özdi, F., Ünal, E. Ö., & Arat, S. (2017). Characterization of Cloned Cattle Obtained by Nuclear Transfer and Their Offspring with mtDNA and Microsatellite Markers. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 14(2), 150-157.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Pérez-Gómez A., **Tüten Sevim E.,** González-Brusi L., Lamas-Toranzo I., Gabriela Hamze J., Galiano-Cogolludo, B., Ramos-Ibeas P., Bermejo-Álvarez, P. (2022). TEAD4 is Dispensable for Bovine Conceptus Elongation. *19th International Congress on Animal Reproduction*, (June 26-30), Bologna/İTALYA.

Galiano-Cogolludo, B., Gabriela Hamze J., Lamas-Toranzo I., Pérez-Gómez A., González-Brusi L., **Tüten Sevim E.,** Ramos-Ibeas P., Bermejo-Álvarez, P. (2022). PGR is not Required for Bovine Hypoblast Migration and Embryonic Disc Formation *in vitro*. *19th International Congress on Animal Reproduction*, (June 26-30), Bologna/İTALYA.

Yıldız B.İ., **Tüten Sevim E.,** Karabağ K. (2021). Programmable Gene Editing Techniques and Their Use in Livestock. *3rd International and 12th National Animal Science Conference*, (November 27-28), Bursa/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Karabağ K. (2019). Bal Arılarında SNP Haplotip Analizlerinde Kullanılan Yazılımlar. *4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress* (April 20-22), Afyon/TÜRKİYE.

Ivgın Tunca R., Karabağ K., **Tüten Sevim E.,** Dogaroglu T. (2018). Determination of genetic variation in some honeybee populations of Turkey using microsatellite loci. *6th International Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress* (October 15-19), Muğla/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Arat S. (2018). Different Methods in MtDNA Analysis of Cloned Animals and Comparison of Their Results. *6th ASM International Congress of Agriculture and Environment*, (October 11-13), Antalya/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Karabağ K. (2018). Softwares for Phylogenetic Analysis in Animal Biotechnology. *6th ASM International Congress of Agriculture and Environment*, (October 11-13), Antalya/TÜRKİYE.

Karabağ K., **Tüten Sevim E.**, Yıldız B.İ., Toparslan E. (2018). Effect of SNP's on the Secondary Protein Structure of Ghrelin Gene in Long-Term Selected Japanese Quail. *International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch*, (May 09-12) Niğde/TÜRKİYE.

Karabağ K., **Tüten Sevim E.** (2018). Effect of SNP's on The Secondary Protein Structure of Prolactin Gene In Long-Term Selected Japanese Quail. *International Poultry Science Congress of WPSA Turkish Branch*, (May 09-12) Niğde/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Sönmez V., Arat S. (2017). Genetic Characterization of Cloned Cattle and Their Generations. *6th International Molecular Biology and Biotechnology Congress*. (December 22-25) Afyonkarahisar/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Arat S. (2017). The Effect of Different Cryoprotectant Combinations on the Viability of Bovine Cartilage Cells. *6th International Molecular Biology and Biotechnology Congress* (December 22-25) Afyonkarahisar/TÜRKİYE.

Tüten Sevim E., Özdil F., Özkan Ünal E., Arat S. (2017). Characterization of Cloned Cattle Produced by Nuclear Transfer and Their Offspring by Using mtDNA and Microsatellite Markers. *2nd International Balkan Agriculture Congress*, (May 16-18) Tekirdağ/TÜRKİYE.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve özet bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Arat S., Pabuccuoğlu S., Sağırkaya H., Nak Y., Alkan S., Özdil F., Özkan Ünal E., Alçay S., Demir K., Arıcı R., **Tüten Sevim E.**, Sönmez V., Kılıçarslan M. R., Üstüner B., Nak D. (2016). Boz ırk klonların ve yavrularının yaşama kabiliyetleri, üreme performanslarının incelenmesi ve moleküler karakterizasyonu. *1. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi* (01-03 Haziran), Samsun/TÜRKİYE.